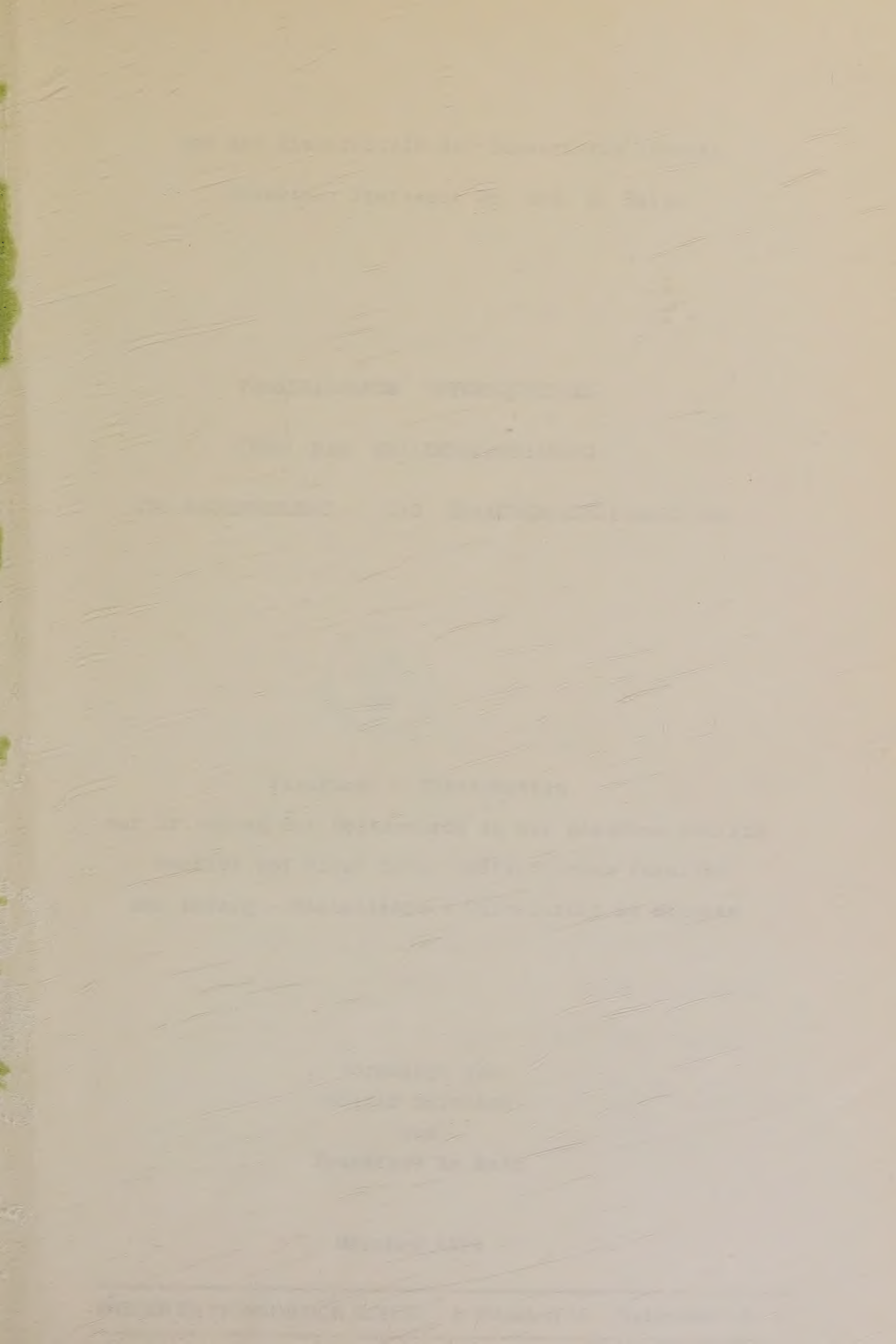


VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN
ÜBER DIE HEINZKÖRPERBILDUNG
IN NEUGEBORENEN- UND
ERWACHSENENERYTHROCYTEN

Rainer Harnisch

1974



Aus der Kinderklinik der Universität München

Direktor: Professor Dr. med. K. Betke

VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN

ÜBER DIE HEINZKÖRPERBILDUNG

IN NEUGEBORENEEN - UND ERWACHSENER ERYTHROCYTEN

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin

verfaßt und einer hohen medizinischen Fakultät

der Ludwig - Maximilians - Universität zu München

vorgelegt von

Rainer Harnisch

aus

Frankfurt am Main

München 1974



Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. E. Kleihauer

Mitberichterstatter: Prof. Dr. K. Betke

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 23. April 1974

INHALTSVERZEICHNIS

A	Einleitung	1
I	Historisches und Entwicklung	1
B	Fragestellung	6
C	Material und Methoden	8
I	Untersuchungsgut	8
a)	Blutproben	
II	Reagentien	8
a)	Herstellung der Lösungen und Puffer	
b)	Färbelösungen	
III	Prinzipielle Versuchsanordnung	11
a)	Standardversuch	
b)	Färbeversuche	
c)	Veränderung der APH-Konzentration	
IV	Prüfung der Heinzkörperbildung unter verschiedenen in vitro Bedingungen	13
a)	Waschen der Erythrocyten	
b)	Mischen von Neugeborenen- und Erwachsenenblut	
c)	Kreuz austausch von Plasma und Ery- throcyten zwischen NS- und A-Blut	
d)	Kreuz austausch von Plasma und Ery- throcyten zwischen NS- und A-Blut nach vorheriger Inkubation mit APH	
e)	Enzymatische Veränderung der Erythro- cytenoberfläche mit Papain	
f)	Prüfung der Permeationsgeschwindig- keit von APH	
V	Untersuchungen zur Bedeutung des MetHb im Verlauf der Heinzkörperbildung	15
a)	Bestimmung der MetHb-Konzentration zu definierten Zeitpunkten des Versuchs- ablaufs	

	b) HK-Bildung in MetHb-Erythrocyten	
VI	Abkürzungen und Begriffe	17
D	E r g e b n i s s e	18
I	Prinzipielle Versuchsanordnung	18
	a) Standardversuch	
	b) Färbeversuche	
	c) Veränderung der APH-Konzentration	
II	Prüfung der Heinzkörperbildung unter verschiedenen in vitro Bedingungen	20
	a) Waschen der Erythrocyten	
	b) Mischen von NS- und A-Blut .	
	c) Kreuzaustausch von Plasma und Ery- throcyten zwischen NS- und A-Blut	
	d) Kreuzaustausch von Plasma und Ery- throcyten zwischen NS- Und A-Blut nach vorheriger Inkubation mit APH	
	e) Enzymatische Veränderung der Erythro- cytenoberfläche mit Papain	
	f) Prüfung der Permeationsgeschwindigkeit von APH	
III	Untersuchungen zur Bedeutung des MetHb im Verlauf der Heinzkörperbildung	28
	a) Bestimmung der MetHb-Konzentration zu definierten Zeitpunkten des Versuchs- ablaufs	
	b) HK-Bildung in MetHb-Erythrocyten	
IV	Tabellen	31
E	D i s k u s s i o n	39
F	L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s ...	48

A E I N L E I T U N G

I Historisches und Entwicklung

Heinzkörper werden nach dem Erlanger Pharmakologen Robert HEINZ benannt, der sie in einer Veröffentlichung im Jahre 1890 erstmals beschrieb (HEINZ 1890). Ähnliche Phänomene waren schon früher von anderen Autoren beobachtet worden (MARCHAND 1879; RIESS 1882; LEWIN 1889; Übersicht bei WEBSTER 1949).

HEINZ fand, daß "Phenylhydrazin und Phenylhydrazinderivate...beim Warmblüter äusserst charakteristische Veränderungen der rothen Blutkörperchen hervor"bringen. Es sind "stark lichtbrechende Kugeln..., die dem Blutkörperchen meist knopfförmig aufsitzen;...zuweilen sind sie völlig losgetrennt und schwimmen, von einem Fetzen Protoplasma umgeben, im Blutplasma herum." HEINZ sah in Methylviolett einen hervorragenden Farbstoff zur Darstellung dieser "farbstoffgerigen Kugeln."

Nach den Angaben von HEINZ sind die Innenkörper pathognomonisch für Phenylhydrazinvergiftungen. In der Folgezeit wurde aber durch klinische und experimentelle Untersuchungen eine Vielzahl von Stoffen bekannt, die Innenkörper bilden können (MOESCHLIN 1940; WILLI 1947; ZUELZER und APT 1949; SCHAFFER 1951; GASSER 1954; COCK 1957; ZINKHAM 1957; BETKE und SCHALL 1958; DAWSON et al. 1958; BETKE 1961;

VALAES 1963; HANSSLER 1964; IRLE 1964; RITTER und SCHULZE 1970. MOESCHLIN 1941; KÜNZER et al. 1953; KÜNZER et al. 1954; BEUTLER 1962). Dazu gehören unter anderem Resorcin, Naphthalin, Sulfonamide, Vitamin-K-Präparate und Guajacol (Übersicht bei FERTMAN 1955). Alle diese Substanzen haben ein hohes Redoxpotential. Besonders wirksame Heinzkörperbildner sind aromatische Amino- oder Nitroverbindungen.

In den letzten Jahren wurden Heinz'sche Innenkörper nach therapeutischer und experimenteller Strahlenbelastung beschrieben (GERHARDT 1965, 1967; NENCI 1967; WEISE et al. 1971).

Während HEINZ "jene farbstoffgierigen Kugeln" noch für "abgetötetes Protoplasma" hielt, "das von den rothen Blutkörperchen ausgestoßen wird", wurden aufgrund von morphologischen, speziell elektronenmikroskopischen Untersuchungen der neueren Zeit folgende Befunde erarbeitet:

1. Heinzkörper sind stets echte Innenkörper; sie liegen der Membran innen an oder weisen zumindest nahe räumliche Beziehungen zur Membran auf; dennoch nimmt sie an ihrer Ausbildung keinen oder keinen sehr wesentlichen Anteil (KÜNZER, SCHÜTZ, BENSCH 1960; SCHÜTZ und KÜNZER 1961; RIFKIND 1965);
2. Die Erythrocytenmembran "wird entweder nicht sichtbar alteriert oder vorgebuckelt oder eingezogen oder bläschenartig abgeschnürt" (BRAUNSTEINER et al. 1950; SCHÜTZ und KÜNZER 1961; RIFKIND 1965);
3. Die Heinzkörper sind zum Teil selbst von einer Membran

umschlossen (BORGES und DESFOAGES 1967), sie können sich frei außerhalb der Erythrocyten befinden (BRAUN-STEINER et al. 1950);

4. Heinzkörper bilden sich in älteren Erythrocyten leichter (RIFKIND 1965; BORGES und DESFORGES 1967);
5. Die Größe der Heinzkörper nimmt mit der Einwirkdauer der toxischen Substanz zu (RIFKIND 1965).

Vermutungen, nach denen die Heinzkörper ihren Ursprung von der Membran nahmen, waren damit verworfen (JUNG 1943; HEUBNER 1942; KIESE und SEIPELT 1943; JUNG 1947).

Hypothesen über die biochemische Struktur der Heinzkörper führten über die Annahme einer teilweisen Zusammensetzung aus Hämoglobin (PAPPENHEIM und SAZUKI 1912; WARBURG et al. 1931; BRENNER 1953; BLAVEN und WHITE 1954; RENTSCH 1968) - wobei PAPPENHEIM aufgrund der Löslichkeitsbedingungen der Heinzkörper vermutete, es handle sich um Lipoid-eiweißverbindungen - zu der bisher gültigen Erklärung von JANDL, ENGLE und ALLEN (1960), es seien oxydative Abbauprodukte des Hämoglobins; dies konnte in späteren Untersuchungen bewiesen werden (BACHMANN und MARTI 1962; KLEIHÄUER und KOHNE 1969). RENTSCH stellte 1968 fest, Heinzkörper seien Gemische aus Protein und Phospholipiden, wobei der Proteinanteil aus denaturiertem Hämoglobin und Stromaproteinen bestehe. Weitere Versuche ergaben brauchbare Vorstellungen zu einzelnen oxydativen Abbauschritten (ALLEN und JANDL 1961; KUSUMOTO und NAKAJIMA 1968; JACOB et al. 1968), während die Veränderungen des Häm-Anteils noch unbefriedi-

gend erklärt werden können (KÜNZER, AMBS, SCHNEIDER 1953; BRÄNNER und ALLISON 1953; JACOB, BRAIN, DACIE 1968; GOLDSTEIN et al. 1968; Zusammenfassung bei JACOB 1970). Danach wird Hämoglobin in Methämoglobin verwandelt, die Sulfhydrylgruppen des Cysteins in Stellung 93 der β -Ketten oxydiert und schließlich auch die vier weiteren SH-Gruppen am Globin oxydiert, so daß das denaturierte Hämoglobin über Wasserstoffbrücken polymerisiert und zu Heinzkörpern präzipitiert.

Aus klinischen und experimentellen Beobachtungen ist bekannt, daß Neugeborene gegenüber Erwachsenen eine größere Heinzkörperempfindlichkeit besitzen (WILLI 1947; GASSER 1953; KÜNZER, AMBS, SCHNEIDER 1954; SANSONE et al. 1958; VEST 1958; TOJA 1960; BETKE 1961; BROWN und BUQUIR 1961; GROSS und SCHROEDER 1963; ULUKUTLU et al. 1966; BORGES und DESFORGES 1967). Dieses Phänomen wird bei Anwendung bestimmter Medikamente besonders deutlich (GASSER 1953; DAWSON et al. 1958; BETKE 1961; VALAAS et al. 1963). Die Ursache für die erhöhte Heinzkörperempfindlichkeit Neugeborener ist bisher nicht vollständig geklärt. Als mögliche Faktoren wurden hauptsächlich die Erythrocytenenzyme, das fetale Hämoglobin und Membraneigenschaften diskutiert (JONES 1949; KÜNZER und SCHNEIDER 1953; BRÄNNER und ALLISON 1953; BEUTLER et al. 1955; KÜNZER et al. 1955; CARSON et al. 1956; KÜNZER 1956; WALLER, LÖHR und TABATABAI 1957; MILLS 1957; DAWSON et al. 1958; BEUTLER 1959; JANDL et al. 1960; COHEN und HOCHSTEIN 1963; CORT et al. 1961; ALLEN und JANDL 1961; Zusammenfassung

bei LÖHR und WALLER 1962; WALLER und LÖHR 1963; COHEN und HOCHSTEIN 1963; LÖHR und LAUSECKER 1964; BRACCI et al. 1965; RIFKIND und DANON 1965; WALLER und SCHOEN 1966; ULUKUTLU et al. 1966; GROSS et al. 1967; NECHELES, BOLES, ALLEN 1968; JACOB, BRAIN, DACIE 1968; BRACCI et al. 1969; NECHELES et al. 1969; JACOB 1970; KLEIHAUER et al. 1970).

Anhand systematischer in vitro Studien haben KLEIHAUER et al. 1970 grundsätzliche Bedingungen der experimentellen Heinzkörperbildung in Neugeborenen- und Erwachsenenerythrocyten erarbeitet. Die Untersuchungen an Erythrocyten nach Austauschtransfusion hatten den Befund ergeben, daß sich die Heinzkörperempfindlichkeit transfundierter Erwachsenenerythrocyten im Kreislauf von Neugeborenen derjenigen von Neugeborenen angleicht. Als Erklärung für diese "erworbene Heinzkörperempfindlichkeit" wurden sekundäre Veränderungen an der Zelle, speziell Veränderungen im Phospholipidgehalt der Zellmembran, in Betracht gezogen. Gleichzeitig wurde auf die mögliche Bedeutung von Membraneigenschaften für die Heinzkörperempfindlichkeit hingewiesen (KLEIHAUER et al. 1970).

Auf der Grundlage der von KLEIHAUER und Mitarbeitern (1970) aus unserer Arbeitsgruppe mitgeteilten Ergebnisse wurde in der vorliegenden Arbeit die Heinzkörperbildung vergleichsweise in Neugeborenen- und Erwachsenenerythrocyten anhand von weiteren in vitro Experimenten geprüft.

1. In der ersten Versuchsserie wurden die methodischen Vorbedingungen erarbeitet und exakt standardisiert. Um eine optimale Anfärbung der Heinzkörper zu erreichen, wurden verschiedene Supravitalstoffe miteinander verglichen.
2. Die Beobachtung einer erhöhten Heinzkörperempfindlichkeit von Erwachsenenerythrocyten nach Austauschtransfusionen weist auf eine Abhängigkeit der Heinzkörperbildung vom umgebenden Milieu hin. Durch Waschen der Erythrocyten, Mischen von Neugeborenen- und Erwachsenenblut und Kreuz austausch von Plasma und Erythrocyten aus Neugeborenen- bzw. Erwachsenenblutproben wurden Erythrocyten unterschiedlichen Milieuänderungen unterworfen und anschließend ihr Verhalten gegenüber β -Acetylphenylhydrazin untersucht.
3. Zur Prüfung der Permeationsgeschwindigkeit von β -Acetylphenylhydrazin in die Zelle wurden Blutproben nach unterschiedlich langer Inkubationszeit von dem APH-Plasma befreit und getrennt weiterverfolgt. Das Plasma wurde in einem Teil der Versuche frischen Erythrocyten zu-

gesetzt, um seine Wirksamkeit als heinzkörperbildendes Agens zu testen.

4. Die Heinzkörperbildung mit β -Acetylphenylhydrazin bewirkt prinzipiell eine oxydative Denaturierung des Hämoglobins mit Methämoglobinbildung. Die Bedeutung des Methämoglobins ist bisher umstritten. Zur Klärung dieser Frage wurde in einer Versuchsserie die Methämoglobinkonzentration im Verlauf der Heinzkörperbildung vergleichsweise in Neugeborenen- und Erwachsenenblut bestimmt, die unter Standardbedingungen mit APH inkubiert waren.

C M A T E R I A L und M E T H O D E N

I U n t e r s u c h u n g s g u t

a) B l u t p r o b e n

1. Nabelschnurblut: Die Blutproben wurden unmittelbar nach der Geburt dem plazentaren Teil der Nabelschnur entnommen und durch Zusatz von 1/10 Volumen 3,8%iger Natriumcitratlösung ungerinnbar gemacht. Alle Blutproben wurden innerhalb von 24 Stunden verwertet.
2. Erwachsenenblut: Jeweils gleichzeitig mit dem Nabelschnurblut wurde das Erwachsenenblut von hämatologisch gesunden Spendern (Laborpersonal) aus der vena cubitalis entnommen und durch Zusatz von 1/10 Volumen 3,8%iger Natriumcitratlösung ungerinnbar gemacht.

II R e a g e n t i e n

Natriumchlorid, Kaliumdihydrogenphosphat, Dinatriumhydrogenphosphat, D(+) Glucose, Nilblausulfat, Brillantgrün, Neutralrot, Methylviolett, Kaliumhexacyanoferrat, Kaliumcyanid, Natriumnitrit, Natriumnitrat, abs. Äthanol und Citronensäure wurden von der Fa. Merck (Darmstadt) bezogen.

Beta-Acetylphenylhydrazin war ein Produkt der Fa. Schuchart, München. Papain wurde von der Fa. Biotest, Frankfurt am Main, bezogen.

Sämtliche Reagentien waren von p.A. Qualität.

a) Herstellung der Lösungen und Puffer

1. 0,9%ige NaCl - Lösung

2. Isotonische Phosphatpufferlösung pH 7,4 (0,136 M).

Es wurden 4,404 g KH_2PO_4 und 18,545 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ in 1000 ml aqua dest. gelöst und der pH-Wert auf 7,4 eingestellt.

3. Beta - Acetylphenylhydrazin - Lösung (B-APH) 1% = 66 M. .

Eine 1%ige B-APH-Lösung wurde durch Auflösen von 100 mg APH in 8,8 ml isotonischer Phosphatpufferlösung und 1,2 ml 0,9%iger NaCl-Lösung hergestellt. (BEUTLER, DERN und ALVING 1955). Zu jeweils 10 ml APH-Lösung wurden 30 mg Glucose zugegeben. Der Ansatz wurde unter ständigem Rühren auf einem Magnetrührer aufgelöst und nach 1 Stunde filtriert. Die Lösung wurde unmittelbar vor Versuchsbeginn angesetzt.

4. Papain (Biotest^R).

Der Inhalt einer Originalampulle Papain wurde in 2 ml aqua dest. bzw. 2 ml isotonischem Kochsalz-Phosphatpuffer aufgelöst und 10 Minuten bei 37°C aktiviert.

5. Phosphatpuffer nach Sørensen 2M pH 6,8.

34,6 g KH_2PO_4 + 45,25 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ wurden in einen Meßkolben von 250ml gebracht, mit aqua dest. aufgefüllt, im Wasserbad bei etwa 60°C gelöst und mehrmals aufgeschüttelt, bis eine klare Lösung entstand (Stammpuffer, der zum Gebrauch 20fach verdünnt wurde).

6. Kaliumhexacyanoferrat (III), $K_3(Fe(CN)_6)$.

Es wurde eine 5%ige $K_3(Fe(CN)_6)$ -Lösung in 0,25%iger Na_2CO_3 -Lösung hergestellt.

7. KCN - Lösung.

Es wurde eine 5%ige KCN - Lösung hergestellt.

8. 0,18 M Natriumnitrit - Lösung.

1,25 g $NaNO_2$ wurden in 88 ml isotonischen Phosphatpuffers pH 7,4 und 12 ml 0,9%iger $NaCl$ - Lösung gelöst (0,18 M).

9. 0,18 M Natriumnitrat - Lösung.

1,53 g $NaNO_3$ wurden in 88 ml isotonischen Phosphatpuffers pH 7,4 und 12 ml 0,9%iger $NaCl$ - Lösung gelöst (0,18 M).

10. Citronensäure - Phosphatpuffer nach McIlvane pH 3,2.

Phosphatpuffer: 35,6 g $NaHPO_4 \times 2 H_2O$ wurden in 1000 ml aqua dest. gelöst; Citronensäure: 21,01 g $C_6H_8O_7 \times H_2O$ auf 1000 ml aqua dest..
24,7 ml der Phosphatpufferlösung + 75,3 ml der Citronensäurelösung ergeben den Puffer mit pH 3,2.

b) Färbelösungen

1. Nilblausulfatlösung

Um die Heinz'schen Innenkörper anzufärben, wurde eine 0,5%ige Nilblausulfatlösung in 0,9%iger $NaCl$ -Lösung verwandt. Durch Zentrifugieren und Filtrieren wurden ungelöste Teilchen entfernt.

2. Brillantgrün/Neutralrot (Methode nach SCHWAB, LEWIS 1969)
Ebenfalls wurden die Heinzkörper mit einer jeweils 0,5%igen Lösung in 0,9%iger NaCl-Lösung angefärbt.
3. Methylviolett 6B (Merck^R)
Es wurde eine 0,5%ige Lösung in 0,9%iger NaCl-Lösung hergestellt.
4. 1%ige saure Hämatoxylinlösung nach Ehrlich-Romeis
Die Lösung wurde gebrauchsfertig aus der Universitäts-Apotheke bezogen.
5. 0,1%ige wässrige Erythrosinlösung

III Prinzipielle Versuchsanordnung

a) Standardversuch

Als Ansatz wurden jeweils 2 Teile Erwachsenen- oder Nabelschnurblut (2 ml) mit 1 Teil der 66 mM APH - Lösung (1 ml) versetzt (entsprechend einer APH - Endkonzentration im Ansatz von 22 mM) und in geschlossenen Zentrifugenröhrchen im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Vor und sofort nach der APH - Zugabe wurden Untersuchungsproben zur Heinzkörperzählung entnommen, danach bei NS - Blut in der 1. Stunde alle 10 Minuten, anschließend zu jeder halben Stunde. Bei A - Blut wurde alle 30 Minuten eine Probe untersucht. Jeweils 1 Tropfen des Inkubationsgemisches wurde mit der gleichen Menge 0,5%iger Nilblausulfatlösung in einer Tüpfelplatte zusammengebracht und durch Blasen mit einer Pipette gut durchmischt. Die

Tüpfelplatte stand in einer feuchten Kammer (eine mit feuchtem Filterpapier ausgelegte Petrischale). Nach 20minütiger Inkubation bei 37°C im Brutschrank wurden Ausstrichpräparate auf sorgfältig entfetteten und markierten Objektträgern angefertigt. Die Heinzkörper-haltigen Erythrocyten wurden mit der Ölimersion unter Benutzung eines quadratischen Zählfensters gezählt. Insgesamt wurden pro Präparat 1000 Zellen ausgezählt.

b) Färbeversuche

-Vergleichsweise wurden Ausstrichpräparate mit Brillantgrün/Neutralrot - Färbung hergestellt (in Anlehnung an die Vorschrift von SCHWAB und LEWIS 1969): hierbei wurde 1 Vol. Blut und 1 Vol. Neutralrot durchmischt. Nach 1 Minute erfolgte die Zumischung von 2 Vol. Brillantgrün, und nach 3 Minuten wurden Ausstrichpräparate angefertigt.

-Gleiche Volumenteile Blut und Methylviolett (0,5%ig in 0,9%iger NaCl - Lösung) wurden gemischt und bei 37°C inkubiert. Ausstriche nach 1, 3, 6 und 24 Stunden.

c) Veränderungen der APH - Konzentration

In einigen Versuchen wurde die Geschwindigkeit der Heinzkörper - Bildung in Abhängigkeit zur verwendeten APH - Menge beobachtet. Es wurden 1 ml, 0,6 ml und 0,4 ml der 1%igen APH - Lösung zu 2 ml NS - Blut oder A - Blut zugesetzt.

IV Prüfung der Heinzkörperbildung unter verschiedenen in vitro Bedingungen.

a) W a s c h e n der Erythrocyten

Entsprechende Blutproben wurden 5 Minuten lang bei 3000 U/min zentrifugiert, das Plasma verworfen und 1mal, 5mal bzw. 10mal mit 0,9%iger NaCl - Lösung gewaschen. Danach wurde der Hämatokrit auf 40 Vol% eingestellt und die Heinzkörperbildung unter Standardbedingungen untersucht.

b) M i s c h e n von NS - und A - Blut

Blutgruppengleiches NS- und A - Blut wurde zu gleichen Teilen gemischt und 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach Standardversuch. Zur Identifizierung der Erythrocyten in der Mischung als Neugeborenen- oder Erwachsenenerythrocyten wurde die Säure-Elutionsmethode (BETKE und KLEIHAUER 1958) angewandt: die Nilblausulfatpräparate wurden 30 Minuten luftgetrocknet, 5 Minuten in 96%igem Äthylalkohol fixiert, anschließend gewässert und wieder luftgetrocknet. Die Elution erfolgte im Citronensäure-Phosphatpuffergemisch pH 3,2. Anschließend wurde der Ausstrich gut gewässert, getrocknet und 10 Minuten mit Hämatoxylin gefärbt. Nach kurzem Wässern Gegenfärbung 5 Minuten lang in Erythrosinlösung. Die Auswertung erfolgte im Mikroskop mit der Ölimmersion.

c) Kreuzaustausch von Plasma und Erythrocyten zwischen
Neugeborenen - und Erwachsenenblut

Nach 5 Minuten Zentrifugieren bei 3000U/min wurden jeweils NS-Plasma + A-Erythrocyten und A-Plasma + NS-Erythrocyten zusammengebracht und 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend Standardversuch.

d) Kreuzaustausch von Plasma und Erythrocyten zwischen
Neugeborenen - und Erwachsenenblut nach vorheriger
Inkubation mit APH

Nach 5minütiger Inkubation der NS- und A-Blutproben mit APH wurde, nach Zentrifugation, das Plasma sowohl von NS- wie von A-Blut jeweils frischen A- und NS-Erythrocyten zugesetzt.

e) Enzymatische Veränderung der Erythrocytenoberfläche
mit Papain

Mit 2 ml aktiviertem Papain wurde A-Blut, das auf einen Hämatokritwert von 40 gebracht worden war, 30 Minuten inkubiert. Danach Standardversuch. Papain wurde sowohl mit aqua dest. als auch mit Phosphatpuffer-NaCl-Gemisch aktiviert.

f) Prüfung der Permeationsgeschwindigkeit von APH

-2 ml einer NS- oder A-Blutprobe wurden mit 0,5 ml APH-Lösung 5, 15 und 30 Minuten inkubiert, danach 15 Minuten bei 5000 U/min zentrifugiert und das Plasma verworfen. Anschließend wurden alle 30 Minuten von den Erythrocyten Ausstriche angefertigt.
-Die Permeation wurde ebenfalls geprüft, nachdem die Erythrocytenoberfläche mit Papain angedaut worden war.

V Untersuchungen zur Bedeutung des Methämoglobins
im Verlauf der Heinzkörperbildung

a) Bestimmung der Methämoglobinkonzentration zu definierten Zeitpunkten des Versuchsablaufes.

In Standardversuchen wurden jeweils zu identischen Zeitpunkten Blutproben zur Heinzkörper-Zählung und Methämoglobin-Bestimmung entnommen. Gleichzeitig wurde im Ausgangsblut ohne APH-Zusatz das Ausmaß der spontanen Oxydation verfolgt.

Die Methämoglobinbestimmung erfolgte nach der Methode von EVELYN und MALLORY, 1938:

2 Tropfen Blut wurden mit 8 ml 0,9%iger NaCl-Lösung vermischt, 5 Minuten bei 3000 U/min. zentrifugiert, der Überstand abgehebert und verworfen. Die verbliebenen Erythrocyten wurden in 8 ml aqua dest. hämolytisiert, dem 0,4 ml 0,1 M Phosphatpuffer pH 6,8 zugegeben wurden. Diese Aufschwemmung wurde 7 Minuten bei 5000 U/min. zentrifugiert. Der Überstand über den Erythrocyten-stromata wurde zu gleichen Teilen auf zwei Reagensgläser verteilt. Die eine Hälfte blieb ohne Zusatz (Probe 1), zur anderen Hälfte wurden 2 Tropfen Kaliumhexacyanoferrat hinzugegeben (Probe 2), und damit das Hb zu 100% in Met-Hb umgewandelt. Die Extinktionen wurden bei 630 nm im Zeiss Spektralphotometer PM Q II abgelesen. Anschließend wurden zu beiden Proben jeweils 2 Tropfen KCN zugesetzt und erneut die Extinktionen bei 630 nm gemessen.

Aus den vier gemessenen Extinktionswerten ließ sich nach folgender Formel der Met-Hb-Gehalt berechnen:

$$\frac{\text{Probe 1} - (\text{Probe 1} + \text{KCN})}{\text{Probe 2} - (\text{Probe 2} + \text{KCN})} \times 100 = \% \text{ Met-Hb.}$$

b) Heinzkörperbildung in MetHb-Erythrocyten

Durch 20minütige Inkubation der Blutproben mit einer 0,18 M Natriumnitrit-Lösung (2 ml NS- oder A-Blut + 2ml NaNO_2) wurde das gesamte Hb in MetHb überführt. Nach Zentrifugieren wurde soviel des Plasma-Nitritlösung-Überstandes abgehebert, daß 2 ml "Blut" zurückblieben.

Dann Zugabe von 0,5 ml APH.

Als Kontrolle dienten Blutproben, denen statt Natriumnitrit Natriumnitrat zugesetzt wurde.

VI Abkürzungen und Begriffe

- a) A - Blut: Erwachsenenblut
- b) NS - Blut: Nabelschnurblut
- c) APH: Beta - Acetylphenylhydrazin
- d) HK - Ery: Erythrocyten, die Heinzkörper enthalten.
- e) Latenzzeit: Zeit von Inkubationsbeginn bis zum Auftreten von 5% HK - Ery.
- f) 50% HK - Wert: Zeit von Inkubationsbeginn bis zum Auftreten von 50% HK - Ery.
- g) 100% HK - Wert: Zeit von Inkubationsbeginn bis zum Auftreten von 100% HK - Ery.

Die unter a) - g) erklärten Begriffe sind in Abb. 1 schematisch erläutert.

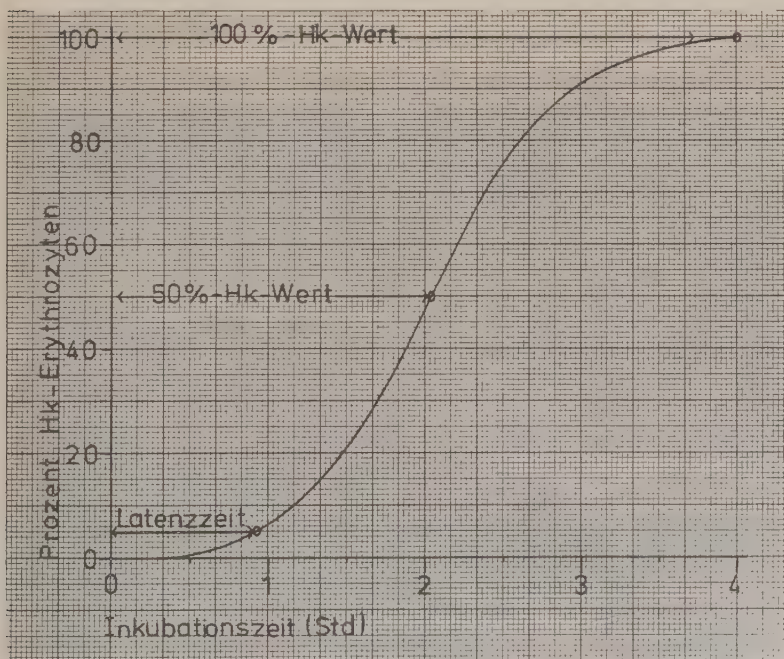


Abb. 1 Prinzipieller Ablauf der Heinzkörperbildung unter den Bedingungen des Standardversuches (schematisch)

D ER G E B N I S S E

I Prinzipielle Versuchsanordnung

a) S t a n d a r d v e r s u c h

Untersucht man die Heinzkörperbildung durch APH in Abhängigkeit von der Zeit, so ergibt sich folgender Ablauf: Nach einer unterschiedlich langen Inkubationszeit bilden sich in allen Erythrocyten Innenkörper aus. Die Zunahme der Heinzkörper pro Zeit erfolgt nicht linear, sondern im ersten Drittel der Kurve relativ langsam; im zweiten Drittel der Kurve folgt ein steiler Anstieg, während der 100% HK-Wert wiederum verzögert erreicht wird. Graphisch dargestellt ergibt sich ein sigmoider Kurvenverlauf (Abb.2).

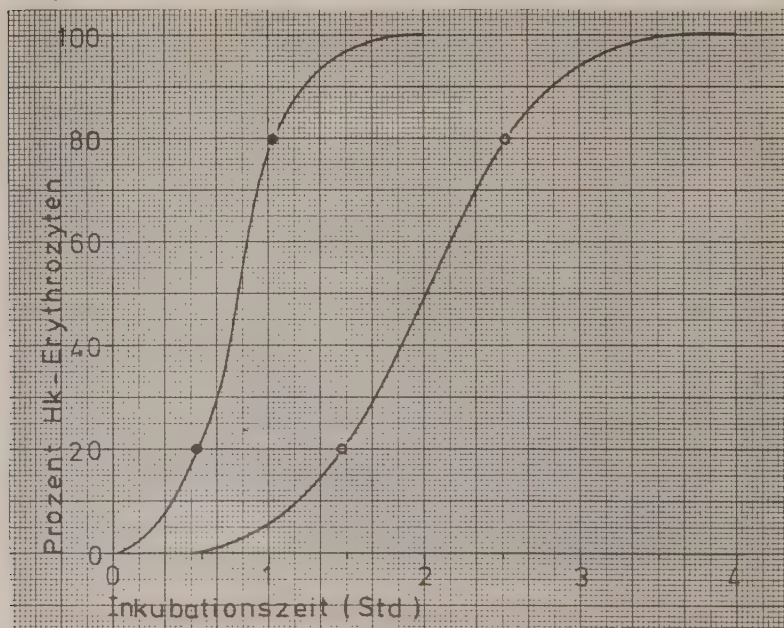


Abb.2 Standardkurve der Heinzkörperbildung in Nabelschnur- und Erwachsenenerythrocyten nach Zusatz von 1 ml APH.
Nabelschnurerythrocyten = geschlossene Symbole
Erwachsenenerythrocyten = offene Symbole.
Vergleiche Tab. 1

Vergleicht man Neugeborenen- und Erwachsenenerythrocyten, so lassen sich prinzipielle Unterschiede feststellen:

1. Die Latenzzeit (= der Zeitraum, in welchem in 5% der Erythrocyten Innenkörper sichtbar werden) ist für NS-Blut wesentlich kürzer als für A-Blut (aus 27 eigenen Untersuchungen: durchschnittlich 10 Minuten; dagegen bei A-Blut (32 Untersuchungen) 55 Minuten).

2. Der 100% HK-Wert wird für NS-Erythrocyten wesentlich rascher erreicht als für A-Erythrocyten (2 Stunden für NS-Blut (27 Untersuchungen) gegenüber 4 Stunden bei A-Blut (32 Untersuchungen)). Vergleiche Tabelle 1.

Demgegenüber ist der Kurvenverlauf sowohl bei NS- als auch bei A-Blut zwischen Latenzzeit und 50% HK-Wert relativ gleich: der 50% HK-Wert wird von NS-Blut nach 40 Minuten, von A-Blut nach 65 Minuten erreicht.

b) Färberversuche

1. Zur Anfärbung der Heinzkörper erwies sich eine 0,5% ige Brillantgrünlösung - Gegenfärbung mit Neutralrot - als durchaus geeignet. Der Arbeitsaufwand ist allerdings größer als bei der Nilblausulfat - Färbung.

2. Bei der Färbung mit Methylviolett ergaben sich folgende Schwierigkeiten:

- die Präparate waren teilweise zu blaß, um sie bewerten zu können.
- die Erythrocyten enthielten viele kleine Vakuolen, die mit Heinzkörpern zu verwechseln waren, auch wenn man sie durch optisches Schneiden zu differenzieren versuchte.

Außerdem stellten die HK sich sehr klein dar - eine weitere Verwechslungsmöglichkeit z.B. mit Farbpartikeln.

- Bei Inkubation mit Methylviolett entstanden nach 1 Stunde einige Stechapfelzellen, nach 4 Stunden waren alle Erythrocyten morphologisch stark verändert.

- In vergleichenden Untersuchungen zeigte sich, daß bei dieser Färbung die HK-Bildung rascher verlief als bei Färbung mit Nilblausulfat oder Brillantgrün/Neutralrot.

- Dagegen traten unter der Einwirkung von Methylviolett auch nach 24 Stunden keine spontanen Heinzkörper auf.

3. Die technisch besten Ergebnisse wurden mit Nilblausulfat erzielt; dieser Farbstoff wurde daher für alle weiteren Versuche benutzt.

c) V e r ä n d e r u n g d e r A P H - K o n z e n t r a t i o n

In diesen Versuchen zeigte sich, daß der Ablauf der HK-Bildung sowohl in NS- als auch in A-Blut gleichmäßig abhängig ist von der APH-Dosis; das heißt, mit höherer Konzentration nimmt die Schnelligkeit der HK-Bildung zu. Mit Änderung der APH-Konzentration blieb der zeitliche Abstand in der Kinetik von NS- und A-Blut erhalten (Abb.3, Tabelle 2).

II Prüfung der Heinzkörperbildung unter verschiedenen in vitro Bedingungen

a) Waschen der Erythrocyten

Waschen der A-Erythrocyten: nach einmaligem Waschen bleibt die Verlaufskurve im Wesentlichen mit der Standard-

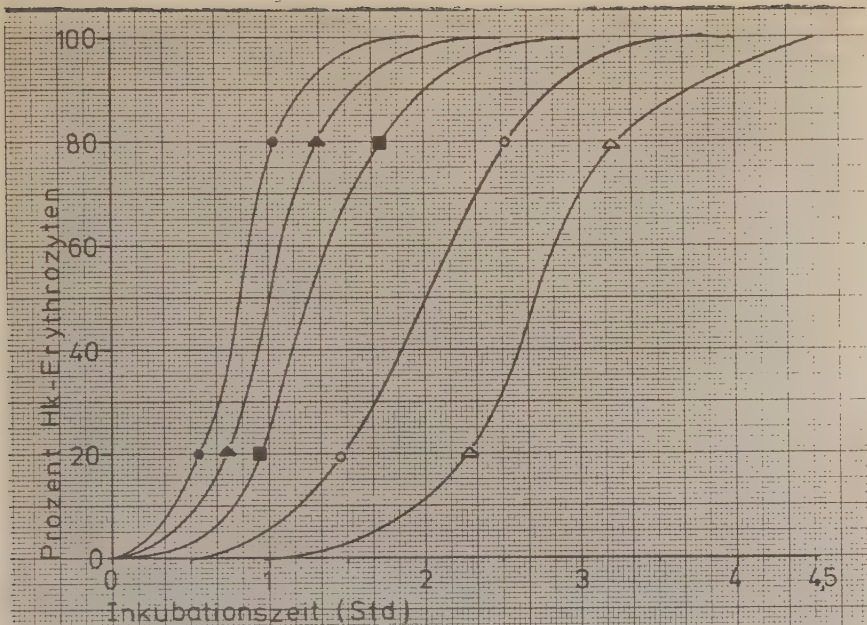


Abb. 3 Abhängigkeit der Heinzkörperbildung von der APH-Konzentration in Nabelschnur- und Erwachsenenerythrocyten. (Vergl. Tab. 2)
 Nabelschnurblut = geschlossene Symbole
 Erwachsenenblut = offene Symbole
 ○ = 1 ml APH; △ = 0,6 ml APH; □ = 0,4 ml APH

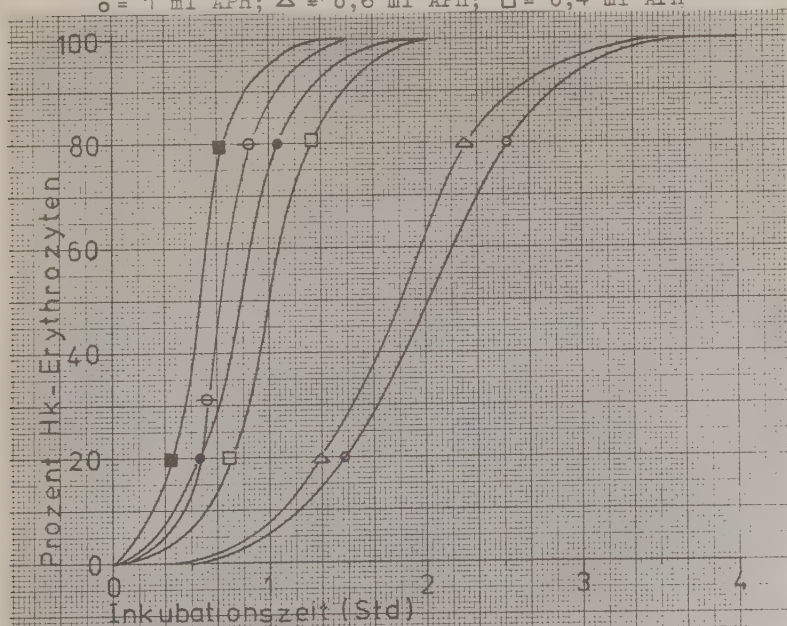


Abb. 4 Abhängigkeit der HK-Bildung vom Waschen der Erythrocyten.
 NS-Blut = geschlossene Symbole; A-Blut = offene Symbole
 ○ = Standardkurve; △ = 1mal Waschen;
 □ = 5mal Waschen; ◇ = 10mal Waschen. Vergleiche Tab. 3

kurve identisch; nach 5maligem Waschen ist die Kurve weitgehend zur NS-Standardkurve hin verschoben, nach 10maligem Waschen verläuft sie sogar rascher als bei NS-Blut. Ebenfalls verschiebt sich die Verlaufskurve von NS-Blut nach 5maligem Waschen. Die Veränderung ist vergleichsweise geringer als bei A-Blut. (Abb.4; Tab.3).

b) M i s c h e n von Leugeborenen- und Erwachsenenblut

Die Kurve des Mischblutes verläuft wesentlich rascher als A-Blut. Bei der Auswertung der Elutionspräparate war eine Differenzierung der HK in den eluierten Zellen nicht zweifelsfrei möglich, solange nur wenige Erythrocyten und diese nur sehr kleine HK enthielten. Es konnte gezeigt werden, daß HbF-haltige Erythrocyten rascher HK bilden als eluierte Erythrocyten, weiterhin, daß alle eluierten Erythrocyten (NS und A) in den Mischblutansätzen rascher HK bilden als A-Erythrocyten aus A-Blut-Ansätzen (Abb.5;Tab.4).

c) K r e u z a u s t a u s c h von Plasma und Erythrocyten zwischen Neugeborenen- und Erwachsenenblut

Für die Ergebnisse der Kreuzaustauschversuche war die Dauer der Vorinkubation (15 Minuten, 1 Stunde oder 2 Stunden) - das heißt ohne APH-Zugabe - ohne Einfluß. Der Kurvenverlauf war in allen Fällen identisch (Abb.6; Tab.5). Es zeigte sich, daß A-Erythrocyten in NS-Plasma rascher HK bilden als A-Blut. Ebenfalls verlief die HK-Bildung in NS-Erythrocyten in A-Plasma schneller als in NS-Blut. Der Einfluß von NS-Plasma auf A-Erythrocyten ist größer als der von A-Plasma auf NS-Erythrocyten.

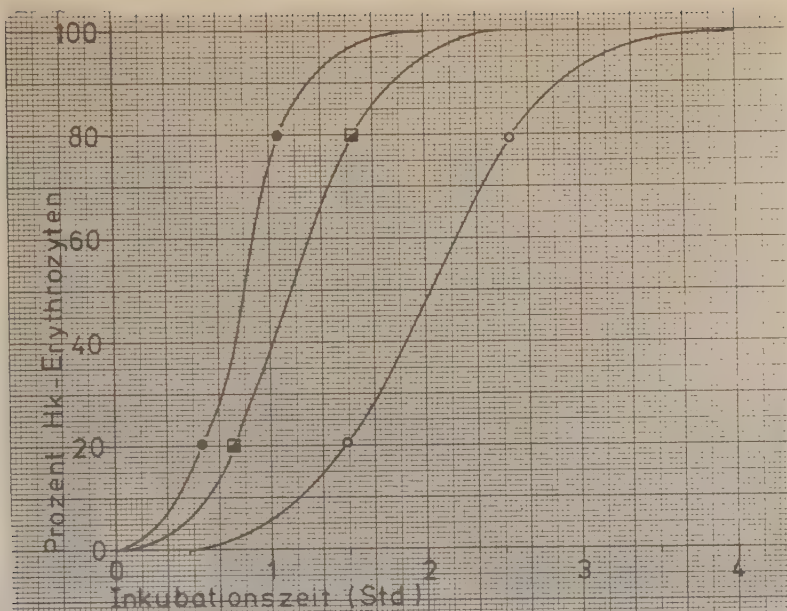


Abb.5 HK-Bildung nach Mischen von NS- und A-Blut. Vergl. Tab.4
 NS-Blut = geschlossene Symbole; A-Blut = offene Symbole
 o = Standardkurve; ■ = Mischblut.

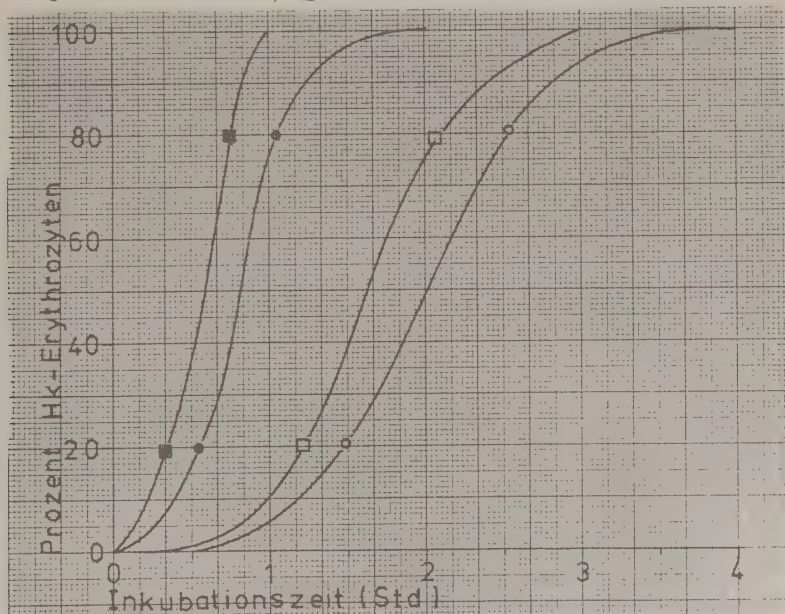


Abb.6 HK-Bildung nach Kreuz austausch von Plasma und Erythrocyten zwischen NS- und A-Blut. Vergl. Tab.5
 NS-Blut = geschlossene Symbole; A-Blut = offene Symbole
 o = Standardkurve; □ = NS-Erythrocyten in A-Plasma
 ■ = A-Erythrocyten in NS-Plasma

d) Kreuz austausch von Plasma und Erythrocyten
zwischen Neugeborenen- und Erwachsenenblut n a c h
vorheriger Inkubation mit APH

Nach Zugabe des Plasmaanteils zeigte sich in der Geschwindigkeit der HK-Bildung folgende Reihenfolge:

1. A-Plasma + NS-Erythrocyten (100% HK nach 3 Stunden)
2. NS-Plasma + NS-Erythrocyten (100% HK nach 3,5 Stunden)
3. A-Plasma + A-Erythrocyten (100% HK nach 5,5 Stunden)
4. NS-Plasma + A-Erythrocyten (100% HK nach 6 Stunden)(Abb.7)

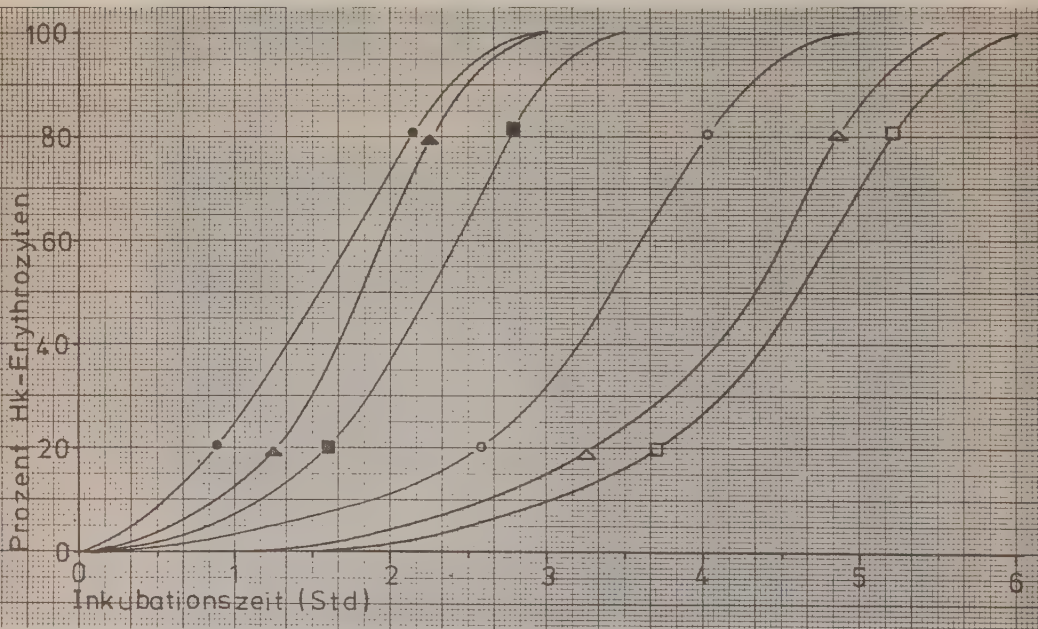


Abb.7 HK-Bildung nach Kreuz austausch von Plasma und Erythrocyten zwischen NS- und A-Blut nach vorheriger Inkubation mit APH.
 NS-Blut = geschlossene Symbole
 A-Blut = offene Symbole
 o = Standardkurve
 ▲ = NS-Ery in A-Plasma; △ = A-Ery in A-Plasma
 ■ = NS-Ery in NS-Plasma; □ = A-Ery in NS-Plasma.

e) Enzymatische Veränderung der Erythrocytenoberfläche mit Papain

Nach Andauen der Erythrocytenmembran mit in aqua dest. aktiviertem Papain wird ein wesentlich rascherer Ablauf der HK-Bildung in A-Erythrocyten beobachtet, die sich in ihrem Verhalten NS-Erythrocyten angleichen (Abb.8).

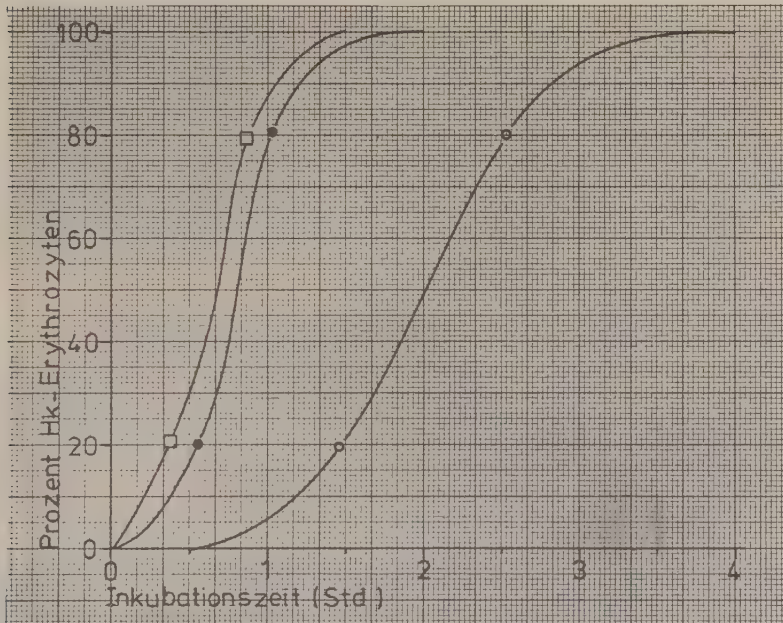


Abb.8 HK-Bildung in A-Erythrocyten nach enzymatischer Veränderung der Erythrocytenoberfläche mit Papain.
NS-Blut = geschlossene Symbole; A-Blut = offene Symbole
o = Standardkurve; □ = mit Papain angedaute A-Erythrocyten

Wenn Papain mit Phosphatpuffer-NaCl-Lösung aktiviert wurde, war der Papain - Effekt geringer. Die Heinzkörperbildungskurve verlief jedoch auch dann für A-Blut beschleunigt, während sich bei NS-Erythrocyten keine Veränderung zeigte (Abb.9).

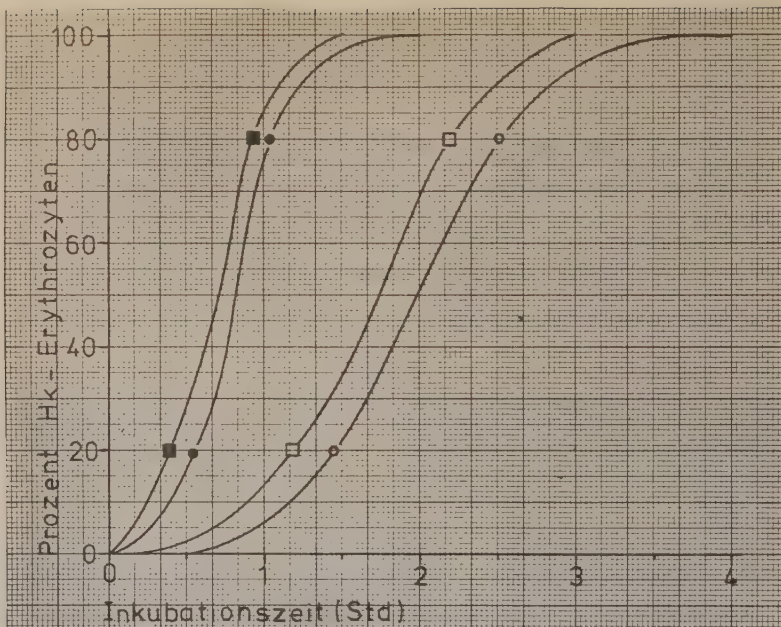


Abb.9 HK-Bildung in NS- und A-Erythrocyten nach enzymatischer Veränderung der Erythrocytenoberfläche mit Papain (in NaCl-Phosphatpuffer aktiviert).
 NS-Blut = geschlossene Symbole; A-Blut = offene Symbole
 ○ = Standardkurve; □ = mit Papain angedaute Erythrocyten

f) Prüfung der Permeationsgeschwindigkeit von APH

Nach 5 Minuten langer Inkubation mit APH wurden Plasma und Erythrocyten der Ansätze durch Zentrifugieren getrennt, das Plasma verworfen und die Erythrocyten gesondert weiter verfolgt. Hierbei ergab sich im Verhalten der NS-Erythrocyten keine Veränderung im Vergleich zu Standardbedingungen, während in A-Blut erst 60 Minuten später der 100% HK-Wert erreicht wurde. Dabei bestand kein wesentlicher Unterschied, ob die Inkubation mit APH 5 oder 30 Minuten dauerte (Abb.10, Tab.6). Entsprechende Versuche nach Vorbehandlung der Erythrocyten mit Papain ergaben eine raschere HK-Bildung in A-Erythrocyten, während sich bei NS-Erythrocyten nur eine geringfügige Beschleunigung zeigte (Abb.11).

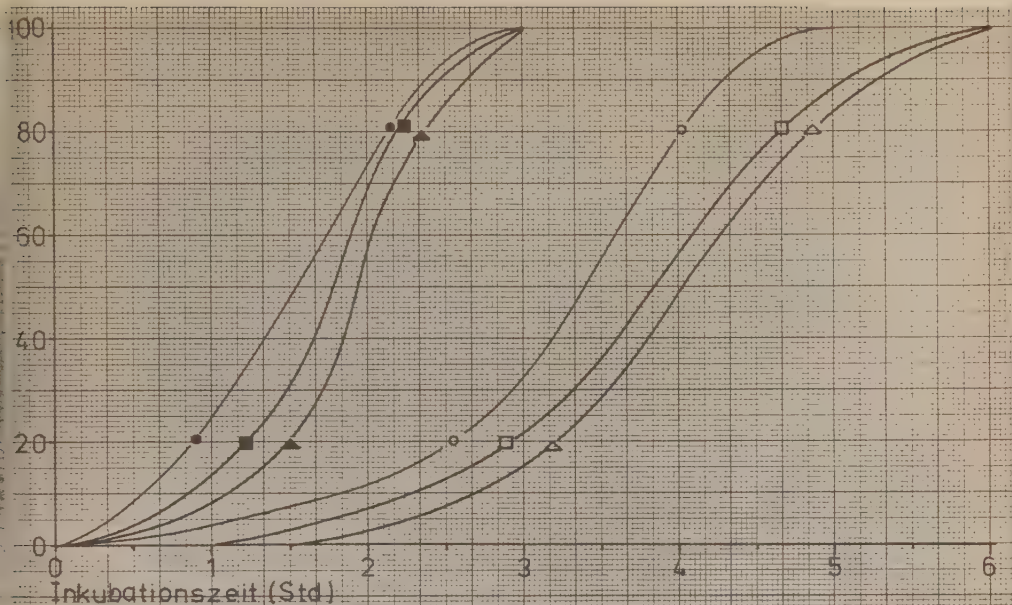


Abb. 10 HK-Bildung in NS- und A-Erythrocyten; 5 bzw. 30 Minuten nach Inkubation mit 0,5 ml APH wurde der Plasmaanteil verworfen. (Vergleiche Tabelle 6).

NS-Blut = geschlossene Symbole; A-Blut = offene Symbole
 ○ = Standardkurve; ▲ = 5 Min. Inkubation mit 0,5 ml APH
 ◻ = 30 Min. Inkubation mit 0,5 ml APH

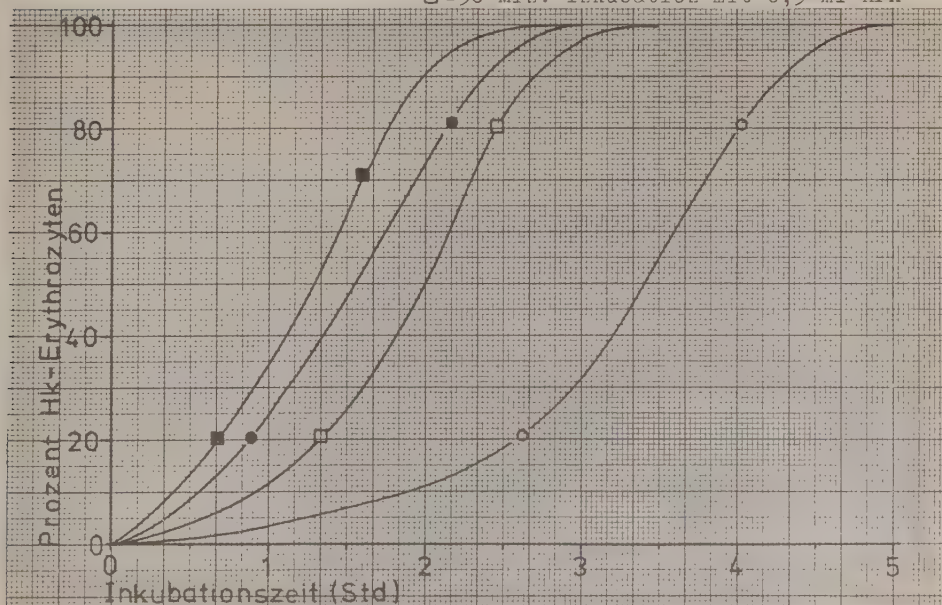


Abb. 11 HK-Bildung in NS- und A-Erythrocyten nach enzymatischer Veränderung der Erythrocytenoberfläche mit Papain. 5 bzw. 30 Min. nach Inkubation mit 0,5 ml APH wurde der Plasmaanteil verworfen.

○ = Standardkurve; ◻ = mit Papain vorbehandelte Erythrocyten

III Untersuchungen zur Bedeutung des Methämoglobins im Verlauf der Heinzkörperbildung

a) Bestimmung der Methämoglobinkonzentration zu definierten Zeitpunkten des Versuchsablaufs

In dieser Versuchsserie wurde der Methämoglobingehalt von Neugeborenen- und Erwachsenenerythrocyten nach Inkubation mit APH gemessen und zum zeitlichen Ablauf der Heinzkörperbildung in Beziehung gesetzt. Die einzelnen Meßdaten wurden in Tabelle 7 und 8 zusammengestellt und auf Abbildung 12 und 13 skizziert. Sowohl in Erwachsenen- als auch in Neugeborenenerythrocyten ist ein Anstieg der Methämoglobin - Konzentration nachweisbar. Neugeborene und Erwachsene zeigen dabei einen deutlichen Unterschied: Zu identischen Zeitpunkten ist die Methämoglobin - Konzentration in Neugeborenenerythrocyten mehr als doppelt so hoch als in Erwachsenenerythrocyten.

In den Kontrollblutproben ohne APH - Zusatz war innerhalb der 8stündigen Beobachtungszeit keine wesentliche Spontanoxydation zu verzeichnen; der Methämoglobin - Wert erreichte sowohl in Neugeborenen- als auch in Erwachsenenblut höchstens 3% vom Gesamtblutfarbstoff. Das unterschiedliche Verhalten von Neugeborenen- und Erwachsenenerythrocyten blieb auch bei einer APH-Endkonzentration von 1,34 mM nachweisbar.

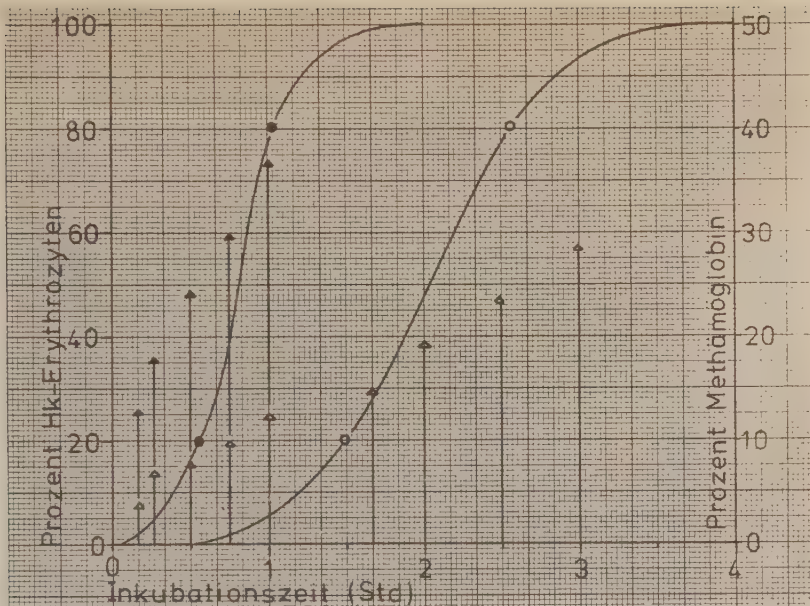


Abb. 12 Bestimmung der MethHb-Konzentration im Vergleich zur HK-Bildung nach Zusatz von 1 ml APH (Vergleiche Tab. 7).
 NS-Blut = geschlossene Symbole; A-Blut = offene Symbole
 o = Standardkurve; Säule mit Δ = MethHb-Konzentration

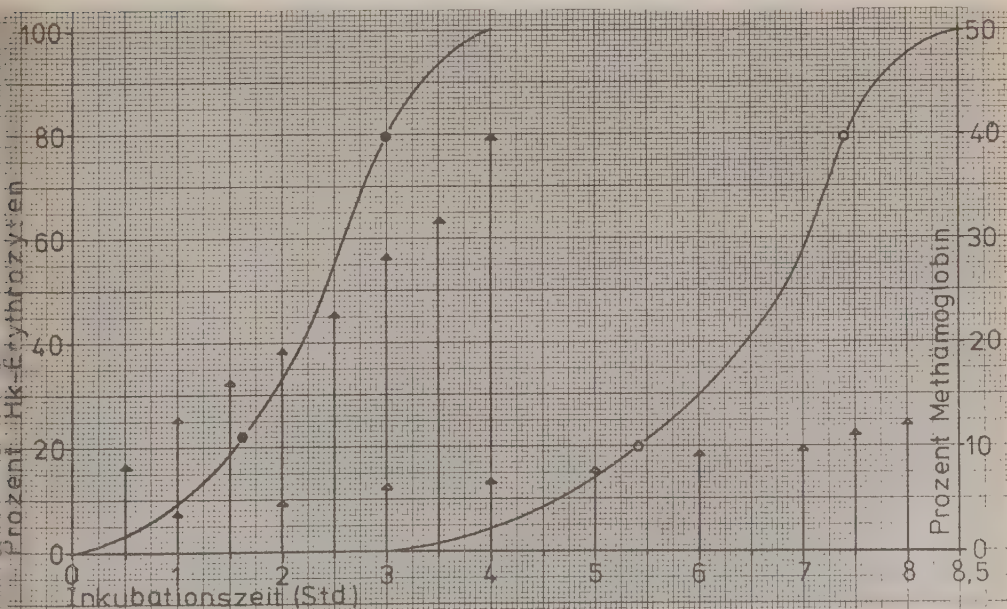


Abb. 13 Bestimmung der MethHb-Konzentration im Vergleich zur HK-Bildung nach Zusatz von 0,2 ml APH (Vergleiche Tab. 8).
 NS-Blut = geschlossene Symbole; A-Blut = offene Symbole
 o = Standardkurve; Säule mit Δ = MethHb-Konzentration

b) Heinzkörperbildung in MethHb - Erythrocyten

In allen Blutproben, bei denen durch Zusatz von Natriumnitrit das gesamte Hämoglobin in Methämoglobin verwandelt worden war, bildeten sich während einer 8stündigen Beobachtungszeit keine Heinzkörper aus (Abb.14, Tab.9). Dagegen trat in den Blutproben, die mit Natriumnitrat inkubiert worden waren, eine normale Heinzkörperbildung ein.

In allen Proben zeigten nach 20 Minuten Inkubation sowohl mit Nitrat als auch mit Nitrit zahlreiche Erythrocyten Vakuolen, die mit Heinzkörpern verwechselt werden konnten; außerdem waren einige Zellen nach der Inkubation deformiert oder schemenhaft geworden.

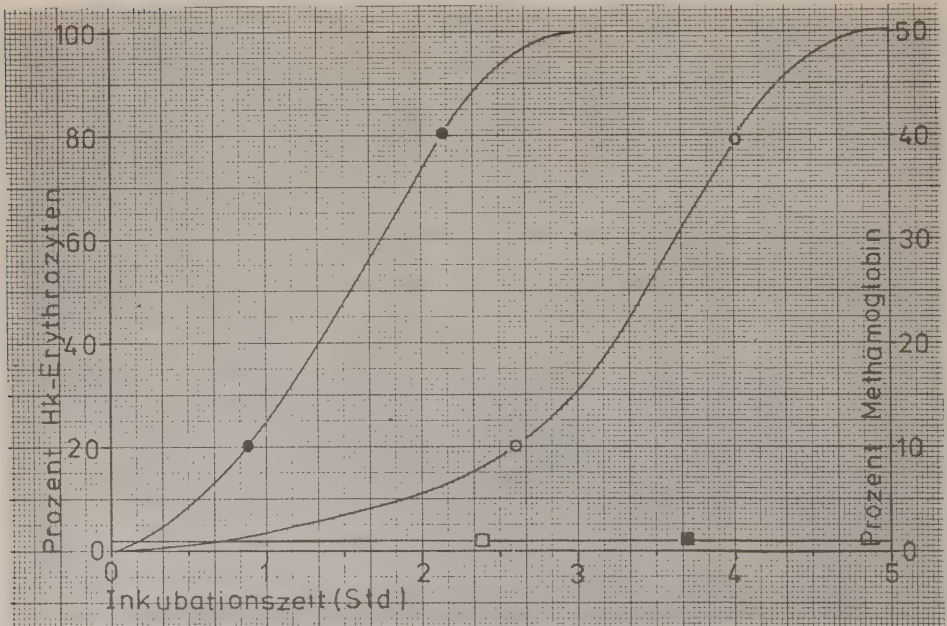


Abb.14 HK-Bildung in MethHb-Erythrocyten (Vergleiche Tab.9).

NS-Blut = geschlossene Symbole; A-Blut = offene Symbole
o = Standardkurve; □ = MethHb-Erythrocyten

IV Tabellen

NS-Blut, 1 ml APH-Lösung (1%)

Zeit (Min.)	Prozent Heinzkörper - Erythrocyten					
0	0	0	0	0	0	0
10	1	3	2	1	4	2,2
20	7	10	9	6	12	5,5
30	14	18	18	12	20	16,4
40	30	34	28	20	38	30
50	56	60	60	46	68	58
60	74	84	77	65	90	78
90	98	100	100	92	100	98
120	100	100	100	100	100	100
Versuch-Nr.	1	2	3	4	5	Mittelwert

A-Blut, 1 ml APH-Lösung (1%)

Zeit (Min.)	Prozent Heinzkörper - Erythrocyten					
0	0	0	0	0	0	0
30	0	1	2	0	0	0,6
60	2	7	12	4	2	5,4
90	14	25	35	14	12	20
120	40	54	68	48	35	49
150	78	84	88	76	64	78
180	94	98	98	96	84	94
210	98	100	100	100	98	99,2
240	100	100	100	100	100	100
Versuch-Nr.	1	2	3	4	5	Mittelwert

Tab.1 Ablauf der Heinzkörperbildung in Nabelschnur- und
Erwachsenenerythrocyten im Standardversuch. (Vergl. Abb. 2)

NS-Blut, 0,6 ml APH-Lösung (1g%)

Zeit (Min.)	Prozent HK - Erythrocyten			
0	0	0	0	0
10	1	0	1	0,3
20	4	2	4	3,3
30	11	6	10	9
40	18	14	16	16
50	34	26	30	30
60	67	46	52	55
90	97	84	92	91
120	100	97	100	99
150	100	100	100	100
Versuch-Nr.	1	2	3	Mittelwert

NS-Blut, 0,4 ml APH-Lösung (1g%)

Zeit (Min.)	Prozent HK - Erythrocyten			
0	0	0	0	0
10	0	0	0	0
20	0	0	1	0,3
30	2	1	4	2,3
40	6	5	10	7
50	10	9	20	13
60	24	22	38	28
90	70	58	76	68
120	84	81	96	87
150	99	98	100	99
180	100	100	100	100
Versuch-Nr.	1	2	3	Mittelwert

A-Blut, 0,6 ml APH-Lösung (1g%)

Zeit (Min.)	Prozent HK- Erythrocyten			
0	0	0	0	0
30	0	0	0	0
60	0	1	2	1
90	2	3	7	4
120	7	10	16	11
150	24	31	36	31
180	64	75	80	73
210	73	87	90	85
240	92	94	96	94
270	100	100	100	100
Versuch-Nr.	1	2	3	Mittelwert

Tab.2 Abhängigkeit der HK-Bildung von der zugesetzten APH-Konzentration in NS- und A-Erythrocyten. Einzel- und Mittelwerte. Vergleiche Abb.3

NS-Blut, 5mal gewaschen

Zeit (Min.)	Prozent HK - Erythrocyten			
0	0	0	0	0
10	7	10	4	7
20	17	32	14	21
30	46	60	35	47
40	70	88	61	73
50	96	98	82	92
60	100	100	97	99
90	100	100	100	100
Versuch-Nr.	1	2	3	Mittelwert

A-Blut, 1mal gewaschen

Zeit (Min.)	Prozent HK - Erythrocyten			
0	0	0	0	0
30	6	1	2	3
60	12	4	8	8
90	26	22	24	24
120	86	40	60	62
150	96	78	90	88
180	100	97	100	99
210	100	100	100	100
Versuch-Nr.	1	2	3	Mittelwert

A-Blut, 5mal gewaschen

Zeit (Min.)	Prozent HK - Erythrocyten			
0	0	0	0	0
30	6	5	6	6
60	50	45	55	50
90	91	90	98	93
120	100	100	100	100
Versuch-Nr.	1	2	3	Mittelwert

A-Blut, 10mal gewaschen

Zeit (Min.)	Prozent HK - Erythrocyten			
0	0	0	0	0
30	18	10	14	14
60	98	80	92	90
90	100	100	100	100
Versuch-Nr.	1	2	3	Mittelwert

Tab.3 Verhalten der HK-Bildung in NS- und A-Erythrocyten nach Waschen. Vergleiche Abb.4 Einzel- und Mittelwerte.

Mischblut

Zeit (Min.)	Prozent HK - Erythrocyten			
0	0	0	0	0
10	0	2	1	1
20	0	6	3	3
30	4	12	8	8
40	12	20	10	14
50	20	32	26	26
60	40	44	36	40
90	64	92	81	79
120	92	100	96	97
150	100	100	100	100
Versuch-Nr.	1	2	3	Mittelwert

Tab.4 HK-Bildung nach Mischen von NS- und A-Blut.
Einzelwerte und Mittelwert. Vergleiche Abb.5

NS-Erythrocyten in A-Plasma

Zeit (Min.)	Prozent HK - Erythrocyten			
0	0	0	0	0
10	8	7	12	9
20	22	21	23	22
30	40	38	42	40
40	67	56	78	67
50	96	80	100	92
60	100	100	100	100
Versuch-Nr.	1	2	3	Mittelwert

A-Erythrocyten in NS-Plasma

Zeit (Min.)	Prozent HK - Erythrocyten			
0	0	0	0	0
30	2	0	4	2
60	12	10	14	12
90	40	28	52	40
120	81	70	86	79
150	91	85	100	92
180	100	100	100	100
Versuch-Nr.	1	2	3	Mittelwert

Tab.5 HK-Bildung nach Kreuz austausch von Plasma und
Erythrocyten zwischen NS- und A-Blut.
Einzelwerte und Mittelwert. Vergleiche Abb.6

NS-Blut, 5 Min. Inkubation mit 0,5 ml APH

Zeit (Min.)	Prozent HK	Erythrocyten	
0	0	0	0
5	0	0	0
30	6	4	2
60	20	10	9
90	58	68	19
120	92	51	59
150	100	78	88
180	100	100	100
Versuch-Nr.	1	2	3
			Mittelwert

NS-Blut, 30 Min. Inkubation mit 0,5 ml APH

Zeit (Min.)	Prozent HK	Erythrocyten	
0	0	0	0
5	0	0	0
30	7	3	5
60	18	12	15
90	42	28	30
120	94	50	70
150	100	85	95
180	100	100	100
Versuch-Nr.	1	2	3
			Mittelwert

A-Blut, 5 Min. Inkubation mit 0,5 ml APH

Zeit (Min.)	Prozent HK	Erythrocyten	
0	0	0	0
30	0	0	0
60	2	0	1,3
90	4	4	4
120	6	9	7
150	14	16	14
180	28	24	27
210	60	38	46
240	82	65	69
270	92	80	84
300	100	94	96
330	100	100	100
360	100	100	100
Versuch-Nr.	1	2	3
			Mittelwert

A-Blut, 30 Min. Inkubation mit 0,5 ml APH

Zeit (Min.)	Prozent HK	Erythrocyten	
0	0	0	0
30	0	0	0
60	0	1	1
90	6	2	3,6
120	10	6	8
150	12	10	12
180	23	18	22
210	38	28	35
240	65	42	54
270	90	50	75
300	100	70	88
330	100	91	97
360	100	100	100
Versuch-Nr.	1	2	3
			Mittelwert

1
35
1

Tab.6 Zur Permeationsgeschwindigkeit von APH nach 5 bzw. 30 Min. Inkubation mit NS- und A-Erythrocyten. Einzel- und Mittelwerte. Vergleiche Abb.10

Neugeborenenblut

Zeit (Min.)	Prozent Methämoglobin				HK
0	1,38	1,86	1,45	1,56	0
10	13,7	15,3	10,9	13,3	2,2
15	18,2	20,3	16,45	18,32	12
30	23,1	25,9	25,2	24,7	16,4
45	28,7	31	32,7	30,8	39
60	30,8	38,7	42,0	37,2	78
90	46,4	51,8	53,5	50,6	98
Versuch-Nr.	1	2	3	Mittelwert	

Erwachsenenblut

Zeit (Min.)	Prozent Methämoglobin				HK
0	1,18	1,7	1,66	1,72	0
10	2,13	5,48	3,88	3,83	
15	5,13	10,38	5,73	7,05	
30	6,9	10,8	7,44	8,38	0,6
45	8,8	11,5	10,9	10,4	
60	11,8	13,25	12,5	12,52	5,4
90	13,2	17,5	15,0	15,2	20
120	16,2	24,7	18,2	19,7	49
150	19,05	28,3	25,02	24,12	78
180	24,8	33,7	29,1	29,2	94
Versuch-Nr.	1	2	3	Mittelwert	

Tab.7 MethHb-Konzentration zu definierten Zeitpunkten des Versuchsablaufs in NS- und A-Blut nach Inkubation mit 1 ml APH. Vergleiche Abb.12
Einzel- und Mittelwerte

Neugeborenenblut

Zeit (Min.)	Prozent Methämoglobin				HK
0	1,52	1,81	1,3	1,51	0
30	8,55	9,49	8,15	8,69	3
60	13,17	17,15	10,6	13,04	9
90	16,0	18,89	15,5	16,79	18,5
120	19,45	20,02	19,05	19,51	33
150	21,0	27,3	20,8	23,0	55
180	27,3	31,5	26,25	28,35	80
210	30,5	36,9	29,4	32,3	93,5
240	40,9	41,6	38,3	40,27	100
Versuch-Nr.	1	2	3	Mittelwert	

Erwachsenenblut

Zeit (Min.)	Prozent Methämoglobin				HK
0	1,975	1,14	1,7	1,605	0
60	5,94	3,94	4,95	4,94	0
120	6,22	4,07	5,61	5,30	0
180	7,82	5,31	6,63	6,59	0
240	8,39	6,77	7,0	7,39	4
300	8,56	7,3	7,94	7,93	14
360	12,10	8,56	8,65	9,77	29,5
420	12,9	8,9	9,5	10,4	57
450	14,9	9,8	10,45	11,42	83
480	16,1	10,5	11,3	12,6	95
Versuch-Nr.	1	2	3	Mittelwert	

Tab.8 Bestimmung der MetHb-Konzentration zu definierten Zeitpunkten des Versuchsablaufs nach Zusatz von 0,2 ml APH zu NS- und A-Blut. Vergleiche Abb.13 Einzel- und Mittelwerte.

Neugeborenenblut

Zeit (Min.)	Prozent HK - Erythrocyten			
0	0	0	0	0
30	14	11	8	11
60	50	50	41	47
90	90	97	74	87
120	100	100	91	97
150	100	100	100	100
Versuch-Nr.	1	2	3	Mittelwert

Erwachsenenblut

Zeit (Min.)	Prozent HK - Erythrocyten			
0	0	0	0	0
30	0	0	0	0
60	4	2	3	3
90	14	5	8	9
120	37	12	29	26
150	76	26	45	49
180	96	52	71	73
210	100	87	95	94
240	100	100	100	100
Versuch-Nr.	1	2	3	Mittelwert

Tab.9 Zur HK-Bildung in MethHb-Erythrocyten.
Einzel- und Mittelwerte von NS- und A-Blut.
Vergleiche Abb14

E DISKUSSION

Bei der Erarbeitung der methodischen Vorbedingungen wurden verschiedene Vitalstoffe verglichen, um ein optimales Färbereagens zur Heinzkörper-Färbung zu ermitteln.

Für diese Arbeit wurde die Färbung mit Nilblausulfat verwendet, die schon sehr früh erprobt worden war (PAPPENHEIM et al. 1912; GUTSTEIN und WALLBACH 1928); andere Farbstoffe (Erythrosin-Victoriablau oder Carbolfuchsin) erwiesen sich nach diesen Untersuchungen (GUTSTEIN) als gleichwertig, als Supravitalfärbungsmethoden waren sie jedoch nicht verwendbar. Ebenso ist der Färbung mit Eosin (Rose bengale) nach PAPPENHEIM eher historische Bedeutung zuzumessen, da sie in der Annahme durchgeführt wurde, es handle sich bei den Heinzkörpern um Lipoideiweißverbindungen. Die Feststellung GUTSTEINS, Nilblausulfat erzeuge Heinzkörper, konnte später von WITTEKIND und RENTSCH (1967) dahingehend modifiziert werden, daß Nilblau in vivo sowohl bei Mäuse- als auch bei Erwachsenenerythrocyten Heinzkörper erzeugt, diese Eigenschaft in vitro jedoch weitgehend verliert; so treten Heinzkörper erst nach etwa 15stündiger Inkubation auf, ihre Ausbildung kann durch Zusatz von Glucose vollständig verhindert werden.

Nach Untersuchungen von SPICER und anderen entfiel Methylenblau als Färbemittel, da sie festgestellt hatten, daß es allein in vivo und in vitro Heinzkörper hervorruft (SPICER und THOMPSON 1949; WITTEKIND und RENTSCH 1967;

RENTSCH und WITTEKIND 1968). Dabei besteht keine Beziehung zur Methämoglobin-Konzentration; zu keinem Zeitpunkt ließ sich bei den in vivo - Versuchen Methämoglobin nachweisen, sondern nur bei den in vitro - Versuchen. Es wurde, übereinstimmend mit SCHWAB und LEWIS 1969, eine gute Färbbarkeit der Heinzkörper mit Brillantgrün/Neutralrot gefunden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen frühere Befunde, nach denen die Unterschiede von Neugeborenen- und erwachsenenerythrocyten im Bezug auf die Heinzkörperbildung im wesentlichen quantitativer Natur sind, die sich im zeitlichen Ablauf durch verschieden lange Latenzzeiten dokumentieren.

Unter dem Einfluß von Milieufaktoren können Erwachsenenerythrocyten ursprüngliche Eigenschaften verlieren und sich dem Verhalten von Neugeborenenerythrocyten mehr oder weniger angleichen.

Experimentell wurde eine Änderung des umgebenden Milieus erreicht durch wiederholtes Waschen der Blutzellen, durch Mischen von Neugeborenen- und Erwachsenenblut und durch Kreuz austausche von Erythrocyten und Plasma von Neugeborenen und Erwachsenen. Die Ergebnisse aus diesen Versuchen zeigen, daß durch sehr unterschiedliche Umgebungsfaktoren eine gleichsinnige Veränderung der Heinzkörperempfindlichkeit von Erwachsenenerythrocyten hervorgerufen werden kann.

In den Experimenten mit Kreuz austauschen sollte die in vivo Situation der Austauschtransfusion in vitro annähernd nachgeahmt werden. Es ist offensichtlich, daß auch unter entsprechenden in vitro Bedingungen eine Beeinflussung im Verhalten der Erwachsenenerythrocyten provoziert wird.

Die neue Umgebung kann theoretisch Veränderungen an allen Zellanteilen, d.h. dem Hämoglobin, den Enzymen und der Membran verursachen. Ein Wechsel im Hämoglobinmuster ist praktisch auszuschließen. Auch wurde die Bedeutung des fetalen Hämoglobins für die Heinzkörperempfindlichkeit bereits durch die Untersuchungen von ULUKUTLU et al. (1966) als unwesentlich erkannt. In unseren Versuchen mit Mischblut waren zu identischen Zeitpunkten mehr Innenkörper in HbF-Zellen als in HbA-Zellen vorhanden. Die HbA-Zellen konnten natürlich nicht als fetale oder adulte Zellen identifiziert werden, bildeten aber in den Mischansätzen rascher Innenkörper als HbA-Zellen in Erwachsenenblut.

Unter neuen Umweltbedingungen sind dagegen durchaus Veränderungen von Enzymaktivitäten sowie der chemischen Zusammensetzung der Zellmembran diskutabel.

Die Beziehungen zwischen enzymatischer Leistung von Erythrocyten und ihrer Empfindlichkeit gegenüber oxydativen Schäden sind umstritten. Dieses Problem ist in den letzten 20 Jahren Gegenstand zahlreicher Veröffentlichungen gewesen (JONES 1949; KÜNZER und SCHNEIDER 1953; BRENNER und ALLISON 1953; BEUTLER et al. 1955; KÜNZER et al. 1955;

CARSON et al.1956; KÜNZER 1956; WALLER, LÖHR, TABATABAI 1957; MILLS 1957; DAWSON et al.1958; BEUTLER 1959; JANDL et al.1960; COHEN und HOCHSTEIN 1961; OORT et al.1961; ALLEN und JANDL 1961; Zusammenfassung bei LÖHR und WALLER 1962; WALLER und LÖHR 1963; COHEN und HOCHSTEIN 1963; LÖHR und LAUSECKER 1964; BRACCI et al.1965; RIFKIND und DANCN 1965; WALLER und SCHOEN 1966; ULUKUTLU et al.1966; GROSS et al.1967; NECHELES,BOLES,ALLEN 1968; JACOB, BRAIN, DACIE 1968; BRACCI et al. 1969; NECHELES et al. 1969; JACOB 1970; KLEIHAUER et al. 1970).

Unter Zugrundelegung vergleichbarer Bezugswerte sind die früher zitierten Enzym-Differenzen zwischen adulten und fetalen roten Blutzellen für die meisten Enzyme unbedeutend. So ist beispielsweise die Aktivität der Glutathionperoxydase als Schutzenzym vor oxydativer Denaturierung des Hämoglobins bei Neugeborenen nicht vermindert. Dies geht aus neueren Untersuchungen von VETRELLA und Mitarbeitern hervor (VETRELLA et al.1970). Einflüsse erhöhter Glutathioninstabilität (TOJA 1960; ZINKHAM 1959) und des Katalasemangels auf die Neigung zur Heinzkörperbildung sind in den letzten Jahren widerlegt worden (GRÖSCHNER 1960; BLUMBERG et al.1962).

Aufgrund umfangreicher Studien hat SCHRÖTER (1971) die Bedeutung intrazellulärer Stoffwechselprozesse, die bei Neugeborenen von der Erwachsenenennorm abweichen, in ihrem ursächlichen Zusammenhang für die Drogenempfindlichkeit fetaler Erythrocyten bezweifelt (SCHRÖTER 1971).

In der Diskussion über die Heinzkörperempfindlichkeit Neugeborener ist in neuerer Zeit die Erythrocytenmembran zunehmend in den Vordergrund gerückt worden. Die Permeation der Zellmembran ist Voraussetzung für die Reaktion chemischer Substanzen auf das intrazelluläre Hämoglobin. Der biochemische Aufbau der Erythrocytenmembran ist inzwischen bekannt, essentielle Bausteine sind Lipide, Proteine, Ionen und Wasser (REED 1968; ROTHESTEIN 1968; POHL und MOSLER 1968; UHLENBRUCK und PARDOE 1968; WEED 1970).

Die Zusammensetzung der Erythrocytenmembran von Neugeborenen und Erwachsenen unterscheidet sich wesentlich durch ihren Gehalt an Phospholipiden (BENTLEY 1962; CROWLEY et al. 1965; HOLLAN und BREUER 1968; NEERHOUT 1968; HÜRTER et al. 1970). Ebenfalls ist die Anzahl bzw. die Stabilität von membran-gebundenen SH - Gruppen, die eine Schutzwirkung vor oxydativen Noxen ausüben (JACOB und JANDL 1961), bei Neugeborenen vermindert (SCHRÖTER und BITTER 1969).

Ein Einfluß des umgebenden Milieus auf die Zellmembran ist insofern denkbar, als Phospholipide zwischen Membran und Plasma beliebig ausgetauscht werden können. Die Phospholipide der Zellmembran spiegeln gleichsam deren Gehalt im Plasma wider (MULDER und VAN DEENEN 1965; COOPER und JANDL 1968; REED 1968; COOPER 1970).

Es ist anzunehmen, daß Alterationen der Membranstruktur die Permeationsgeschwindigkeit für chemische Substanzen verändern. Demnach besteht die Möglichkeit, daß für die erhöhte Neigung zur Innenkörperbildung bei Neugeborenen,

die in unseren Versuchen quantitativ belegt wurde, eine raschere Permeabilität der Zellmembran verantwortlich ist. Theoretisch könnte dieses Phänomen gleichsinnig bei Erwachsenenerythrocyten hervorgerufen werden, wenn diese in den Kreislauf von Neugeborenen verbracht oder Änderungen der Umgebung ausgesetzt werden. Unter dieser Vorstellung fände auch das Phänomen der Latenzzeit eine Erklärung.

In einigen Experimenten versuchten wir, ein Modell zur Prüfung der Permeationsgeschwindigkeit darzustellen. So war bei Neugeborenenerythrocyten, die nach einer definierten Expositionszeit gegenüber β -Acetylphenylhydrazin von dem APH-haltigen Plasma befreit und isoliert weiter beobachtet wurden, ein deutlicher Unterschied im Vergleich zu Erwachsenenzellen nachweisbar: entfernte man das Plasma nach 5 Minuten, so war bereits soviel APH in die Zelle aufgenommen worden, daß die Heinzkörperbildung ohne Verzögerung ablief. Erwachsenenerythrocyten ließen dagegen in identischen Versuchsansätzen eine Verlängerung der Latenzzeit erkennen, außerdem wurde der 100% HK-Wert zeitlich mehr als eine Stunde später erreicht.

Dementsprechend war das APH-Plasma von Neugeborenen, welches nach 5 Minuten langer Inkubationszeit frischen Erythrocyten (aus Nabelschnur- und Erwachsenenblut) zugesetzt wurde, in seiner Wirksamkeit als "Heinzkörperbildner" deutlich gegenüber analog präpariertem Erwachsenen-APH-Plasma eingeschränkt.

Die genannten Befunde erlauben eine Interpretation im

Sinne einer rascheren Permeabilität der Erythrocytenmembran Neugeborener im Vergleich zu Erwachsenen. Zur Sicherung dieser Hypothese sollten konsequenterweise Versuche mit radioaktiv markiertem β -Acetylphenylhydrazin angeschlossen werden. Die technischen Voraussetzungen zur Durchführung der entsprechenden Versuche konnten jedoch im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht erfüllt werden.

Prinzipiell läuft bei der Heinzkörperbildung ein oxydativer Denaturierungsprozeß ab, der mit der Bildung von Methämoglobin einhergeht. Die Bedeutung des Methämoglobins als essentiellen Intermediärprodukts ist bisher umstritten (DACIE 1954; BEUTLER 1959; MAGOS und SZIZA 1959; BEUTLER und BALUDA 1962; BEUTLER 1962; REMTSCH 1968; TUDHOPE und LEECE 1971). Nach den Angaben von HARLEY und MAUER (1960, 1961) geht die Heinzkörperbildung primär mit Veränderungen der Eiweißstruktur des Hämoglobins einher, zu denen die Methämoglobin-Bildung hinzutritt. Andererseits haben MAGOS und SZIZA 1959 festgestellt, daß keine Heinzkörper gebildet werden, solange Methämoglobin in der Zelle vorhanden ist, und daß die Innenkörperbildung erst nach dem Abbau des Methämoglobins zu Verdoglobinen beginnen kann (MAGOS und SZIZA 1959). Im Gegensatz zu diesen Literaturangaben wurde eine Zunahme der Heinzkörperbildung pro Zeiteinheit in Blutzellen bemerkt, in denen mit Natriumnitrit unterschiedlich hohe Methämoglobin-Konzentrationen erzeugt worden waren, bevor sie mit APH inkubiert wurden (KLEIHAUER und KOHNE 1971).

Unter Berücksichtigung der höheren Oxydationsrate des fetalen Hämoglobins (BLTKE 1953; GROSS und SCHROEDER 1963) bzw. der verminderten Reduktionsleistung fetaler Zellen bestimmten wir die Methämoglobin-Konzentration im Neugeborenen- und Erwachsenenblut während der Inkubation mit APH, d.h. zu definierten Zeitpunkten im Versuchsablauf. Erwartungsgemäß fand sich eine mehr als doppelt so hohe Methämoglobin-Bildung bei Neugeborenen im Vergleich zu Erwachsenen.

Sofern das Hämoglobin jedoch zu über 95% als Methämoglobin vorliegt, lassen sich weder in fetalen noch in adulten Zellen Innenkörper erzeugen. Die Ursache hierfür ist unklar, offensichtlich muß ein minimaler Anteil an Oxy-Hämoglobin in der Zelle vorhanden sein, damit die Innenkörperbildung überhaupt einsetzt.

Versucht man, die bisherigen Kenntnisse über die Heinzkörperbildung in Neugeborenen- und Erwachsenenerythrocyten zusammenzufassen, so läßt sich folgende Hypothese aufstellen:

Die funktionellen Eigenschaften roter Blutzellen werden unter anderm vom biochemischen Aufbau der Zellmembran mitbeeinflußt. Die Struktur der Membran ist, zumindest in ihrem Gehalt an Lipiden, abhängig von der Zusammensetzung des umgebenden Plasmas oder generell des umgebenden Milieus. In Relation zu den aktuellen Eigenschaften der Zellmembran gelangen oxydativ wirkende Substanzen rascher in Neugeborenen- als in Erwachsenenerythrocyten hinein.

Die höhere Oxydierbarkeit des fetalen Hämoglobins, zugleich die herabgesetzte Reduktionsleistung in fetalen Blutzellen führt zu einer beschleunigten Methämoglobinbildung, die den ersten Schritt im Vorgang der oxydativen Denaturierung zu Innenkörpern einleitet.

1. ALLEN, D.W. and J.H. JANDL: Oxidative hemolysis and precipitation of hemoglobin.
II. Role of thiols in oxidant drug action.
J. clin. Invest. 40, 454 (1961)
2. BACHMANN, F. and H.R. MARTI: Hemoglobin Zürich.
II. Physicochemical properties of the abnormal hemoglobin.
Blood 20, 272 (1962)
3. BEAVEN, G.H. and J.C. WHITE: Oxidation of phenylhydrazines in the presence of oxyhaemoglobin and the origin of Heinz bodies in erythrocytes.
Nature 173, 389 (1954)
4. BENTLEY, H.P.jr.: Erythrocyte Phospholipids in the Newborn Infant.
Proc. Soc. exper. Biol. 111, 591 (1962)
5. BETKE, K.: Vergleichende Untersuchung der Oxydation von fetalem und Erwachsenen-Oxyhämoglobin durch Natriumnitrit.
Naturwissenschaften 40, 60 (1953)
6. BETKE, K.: Die Anämien des Neugeborenen.
Dtsch. Med. Wschr. 2, 66 (1961)
7. BETKE, K. und E. KLEINHAUER: Fetalen und bleibenden Blutfarbstoff in Erythrocyten und Erythroblasten von menschlichen Feten und Neugeborenen.
Blut 4, 241 (1958)
8. BETKE, K. und H. SCHALL: Akute hämolytische Innenkörperanämie mit Methämoglobinämie und Methämalbuminämie bei einem Neugeborenen, wahrscheinlich bedingt durch Naphthalin.
Z. Kinderheilk. 81, 379 (1958)
9. BEUTLER, E.: The Hemolytic Effect of Primaquine and Related Compounds: a Review.
Blood 14, 103 (1959)
10. BEUTLER, E.: Drug-induced Haemolytic Anaemias and the Mechanism and Significance of Heinz Body Formation in Red Blood Cells.
Nature 196, 1095 (1962)
11. BEUTLER, E. and M.C. BALUDA: The Role of Methemoglobin in oxidative Degradation of Hemoglobin.
Acta haemat. 27, 321 (1962)

12. BEUTLER, E., R.J. DEAN and A.S. ALVING: The hemolytic effect of primaquine. VI. An in vitro test for sensitivity of erythrocytes to primaquine.
J. Lab. clin. Med. 45, 40 (1955)
13. BLUMBERG, A., H.R. MARTI, F. JEUNET und H. AEBI:
Katalase- und Hämoglobindifferenzierung bei Fällen von Akatalasie.
Schw. Med. Wschr. 42, 1324 (1962)
14. BORGES, A. and J.F. DESFORGES: Studies of Heinz Body Formation.
Acta haemat. 37, 1 (1967)
15. BRACCI, R., R. SEELER, N. RUDOLPH, J.H. KOCHEN and R.T. GROSS: Erythrocyte glutathione peroxidase activity and hydrogen peroxide sensitivity: A mechanism for drug-induced hemolysis in the newborn.
J. Pediat. 67, 938 (Abstract) (1965)
16. BRACCI, R., E. CORVAGLIA, F. PRINCI, F. BETTINI and C. PINDINELLI: The role of GSH-peroxidase deficiency in the increased susceptibility to Heinz body formation in the erythrocytes of newborn infants.
Ital. J. Biochem. 18, 100 (1969)
17. BRAUNSTEINER, H., F. PAKESCH und E.E. REIMER: Neuere Ergebnisse über die Innenkörperstruktur.
Wien. klin. Wschr. 62, 244 (1950)
18. BRÄNNER, S. and A.C. ALLISON: Catalase inhibition: A Possible Mechanism for the Production of Heinz Bodies in Erythrocytes.
Experientia 9, 381 (1953)
19. BROWN, A.K. and S.L. BUQUIR: Spontaneous Heinz body formation in full-term and premature infants.
Am. J. Dis. Child. 102, 589 (1961)
20. CARSON, P.E., C.L. FLAMAGAN, C.E. ICKES and A.S. ALVING: Enzymatic Deficiency in Primaquine-Sensitive Erythrocytes.
Science 124, 484 (1956)
21. COCK, T.C.: Acute Hemolytic Anemia in the Neonatal Period.
Am. J. Dis. Child. 94, 77 (1957)
22. COHEN, G. and P. HOCHSTEIN: Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase and Detoxification of Hydrogen Peroxide in Human Erythrocytes.
Science 134, 1756 (1961)
23. COHEN, G. and P. HOCHSTEIN: Glutathione Peroxidase: The Primary Agent for the Elimination of Hydrogen Peroxide in Erythrocytes.
Biochemistry 2, 1420 (1963)

24. COOPER, R.A.: Lipids of Human Red Cell Membrane: Normal Composition and Variability in Disease. *Seminars in Hematology* 7, 296 (1970)
25. COOPER, R.A. and J.H. JANDL: Physiologic and pathologic alterations of red cell lipids, membrane area, and shape.
In: Stoffwechsel und Membranpermeabilität von Erythrocyten und Thrombocyten, hrsg. von DEUTSCH, GERLACH und MOSER, Thieme Verlag, Stuttgart 1968, p. 376
26. CROWLEY, J., P. WAYS and J.W. JONES: Human Fetal Erythrocyte and Plasma Lipids.
J. clin. Invest. 44, 989 (1965)
27. DACIE, J.V.: The Haemolytic Anaemias, Congenital and Acquired.
London, J. and A. Churchill, 1954
28. DANSON, J.P., W.W. THAYER and J.F. DESFORGES: Acute Hemolytic Anemia in the Newborn Infant due to Naphthalene Poisoning. Report of Two Cases, with Investigations into the Mechanism of the Disease.
Blood 13, 1113 (1958)
29. EVELYN, K.A. and H.T. MALLOY: Microdetermination of oxyhemoglobin, methemoglobin and sulfhemoglobin in a single sample of blood.
J. biol. Chem. 126, 655 (1938)
30. FERTMAN, M.H. and M.B. FERTMAN: Toxic anemias and Heinz Bodies.
Medicine 34, 131 (1955)
31. GASSER, C.: Die hämolytische Frühgeburtenanämie mit spontaner Innerkörperbildung.
Helv. paediat. Acta 8, 491 (1953)
32. GASSER, C.: Perakute hämolytische Innenkörperanämie mit Methämoglobinämie nach Behandlung eines Säuglingsektzems mit Resorcin.
Helv. paediat. Acta 2, 285 (1954)
33. GERHARDT, P.: Heinzkörperbildung und chronische Strahlenbelastung. Vorläufige Mitteilung.
Fortschritte Röntgenstrahlen 102, 609 (1965)
34. GERHARDT, P.: Heinzkörperbildung und chronische Strahlenbelastung. Weitere Mitteilung.
Fortschritte Röntgenstrahlen 107, 529 (1967)
35. GOLDSTEIN, G.W., L. HAMMAKER and R. SCHMID: The Catabolism of Heinz Bodies: an Experimental Model Demonstrating Conversion to Non-Bilirubin Catabolites.
Blood 31, 388 (1968)

36. GRÜSCHNER, E.: Erythrocytenkatalase bei Frühgeborenen und reifen Säuglingen in der Neugeborenenperiode.
Med. Dissertation, Freiburg 1960
37. GROSS, R.T. and E.A.R. SCHROEDER: The relationship of triphosphopyridine nucleotide content to abnormalities in the erythrocytes of premature infants.
J. Pediat. 63, 823 (1963)
38. GROSS, R.T., R. BRACCI, N. RUDOLPH, E.A.R. SCHROEDER and J.A. KOCHEN: Hydrogen Peroxide Toxicity and Detoxification in the Erythrocytes of Newborn Infants.
Blood 29, 481 (1967)
39. GUTSTEIN, M. und G. WALLBACH: Über den Bau der Erythrocyten. III. Mitteilung. Untersuchungen über die Heinz-Ehrlichschen hämoglobinämischen Innenkörper.
Virchows Arch. path. Anat. 267, 144 (1928)
40. HANSSLER, H.: Lebensbedrohliche Naphthalinvergiftung bei einem Säugling durch Vaporindämpfe.
Dtsch. med. Wschr. 89, 1794 (1964)
41. HARLEY, J.D. and A.M. MAUER: Studies on the Formation of Heinz Bodies. I. Methemoglobin Production and Oxyhemoglobin Destruction.
Blood 16, 1722 (1960)
42. HARLEY, J.D. and A.M. MAUER: Studies on the Formation of Heinz Bodies. II. The Nature and Significance of Heinz Bodies.
Blood 17, 418 (1961)
43. HEINZ, R.: Morphologische Veränderungen der rothen Blutkörperchen durch Gifte.
Virchows Arch. path. Anat. 122, 112 (1890)
44. HEUBNER, W.: Heinzkörperchen und Blutfarbstoff.
Klin. Wschr. 21, 520 (1942)
45. HOLLAN, S.R. and J.H. BREUER: On red cell lipids.
Acta Med. Acad. Sci. Hung. 25, 421 (1968)
46. HÜRTER, P., W. SCHRÖTER, I. SCHEDEL and G. GERCKEN: Phospholipids of Red Cells and Blood Plasma in Adults, newborn infants and patients with Rh-Erythroblastosis.
Pediatrics 46, 259 (1970)
47. IRLE, U.: Akute hämolytische Anämie durch Naphthalin-Inhalation bei zwei Frühgeborenen und einem Neugeborenen.
Dtsch. med. Wschr. 89, 1798 (1964)

48. JACOB, H.S.: Mechanisms of Heinz Body Formation and Attachment to Red Cell Membrane.
Seminars in Hematology 7, 341 (1970)
49. JACOB, H.S. and J.H. JANDL: Effects of sulphydryl inhibition on red blood cells.
I. Mechanism of hemolysis.
J. clin. Invest. 41, 779 (1962)
50. JACOB, H.S., M.C. BRAIN and J.V. DACIE: Altered Sulphydryl Reactivity of Hemoglobins and Red Blood Cell Membranes in Congenital Heinz Body Hemolytic Anemia.
J. clin. Invest. 47, 2664 (1968)
51. JACOB, H.S., M.C. BRAIN, J.V. DACIE, R.W. CARRELL and H. LEHMANN: Abnormal Haem Binding and Globin SH-Group Blockade in Unstable Haemoglobins.
Nature 218, 1214 (1968)
52. JANDL, J.H., L.K. ENGLE and D.W. ALLEN: Oxidative hemolysis and precipitation of hemoglobin.
I. Heinz body anemias as an acceleration of red cell aging.
J. clin. Invest. 39, 1818 (1960)
53. JONES, P.E.H. and R.A. McCANCE: Enzyme Activities in the Blood of Infants and Adults.
Biochem. J. 45, 464 (1949)
54. JUNG, F.: Über Heinz - Körperchen.
Klin. Wschr. 22, 42 (1943)
55. JUNG, R.: Über toxische Schädigungen an Erythrocyten.
Klin. Wschr. 24, 459 (1947)
56. KIESE, M. und L. SEIPELT: Bildung und Elimination von Verdoglobinen.
Arch. exper. Path. Pharm. 200, 648 (1943)
57. KLEIHAUER, E., H. BRAUN und K. BETKE: Demonstration von fetalem Hämoglobin in den Erythrocyten eines Blutausriches.
Klin. Wschr. 35, 637 (1957)
58. KLEIHAUER, E., A. BERNAU, K. BETKE, M. KELLER, E. KOHNE und K. RIEGEL: Heinzkörperbildung in Neugeborenenerythrocyten.
Acta haemat. 43, 333 (1970)
59. KLEIHAUER, E. und E. KOHNE: Unveröffentlichte Untersuchungen. 1970
60. KLEIHAUER, E. und E. KOHNE: Heinz Body Formation in Red cells of Newborns.
Vortrag: Europ. Soc. Ped. Res.; Brighton 1971

61. KÜNZER, W. und D. SCHNEIDER: Zur Aktivität der reduzierenden Fermentsysteme in den Erythrocyten junger Säuglinge.
Acta haemat. 9, 346 (1953)
62. KÜNZER, W., E. AMBS und D. SCHNEIDER: Zur Wirkung von Natriumnitrit auf Nabelschnurerhythrocyten.
Klin. Wschr. 25/26, 617 (1953)
63. KÜNZER, W., E. AMBS und D. SCHNEIDER: Untersuchungen zur Heinzkörperbildung in Neugeborenenerythrocyten.
Z. Kinderheilk. 74, 652 (1954)
64. KÜNZER, W., E. SCHÜTZ und E. AMBS: Untersuchungen zur Heinzkörperbildung in Neugeborenenerythrocyten. III. Mitteilung: Zur Aktivität der Katalase im Neugeborenenblut.
Z. Kinderheilk. 76, 48 (1955)
65. KÜNZER, W.: Zur Frage der Heinzkörperbildung in Neugeborenenerythrocyten.
Folia haemat. (Lpz.) 73, 405 (1956)
66. KÜNZER, W., E. SCHÜTZ und J. BENSCH: Untersuchungen zur Heinzkörperbildung in Neugeborenenerythrocyten. VI. Mitteilung: Zur Morphologie der durch Analoga mit Vitamin K-Wirkung und Vitamin C erzeugten Heinzkörper.
Z. Kinderheilk. 83, 471 (1960)
67. KUSUMOTO, S. und T. NAKAJIMA: The Constitution of Heinz Bodies.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. exp. Path. 259, 266 (1967)
68. LEWIN, L.: Über Hydroxylamin. Ein Beitrag zur Kenntnis der Blutgifte.
Arch. f. exper. Path. Pharmacol. 25, 306 (1889)
69. LÖHR, G.W. und H.D. WALLER: Erythrocytenfermente.
In: Blutbildung und Blutumsatz beim Feten und Neugeborenen. Edit. R. KEPP und G. OEHLERT, Beiheft 159, Zeitschr. Geburtsh., Enke Stuttgart 1962
70. LÖHR, G. W. und Ch. LAUSCHKE: zitiert nach G.W.LÖHR: Die enzymopenischen Erythropathien.
Verh. dtsch. Ges. inn. Med. 70, 495 (1964)
71. MAGOS, L. und M. SZIZA: Bildung von Heinz-Körperchen und Hämoglobinveränderungen.
Acta haemat. 22, 51 (1959)
72. MARCHAND, F.: Ueber die Intoxication durch chlor-saure Salze.
Virchows Arch. path. Anat. 77, 455 (1879)

73. MILLS, G.C.: Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *J. biol. Chem.* 229, 189 (1957)
74. MOESCHLIN, S.: Innenkörperanämien durch Entstehung von Methämoglobin infolge Dagénan-Wirkung (Sulfapyridin). *Schw. Med. Wschr.* 21, 786 (1940)
75. MOESCHLIN, S.: Versuche über die Entstehung von Innenkörpern in Erythrocyten (Heinzsche Körperchen) in vivo und vitro durch Sulfanilamid-derivate und Phenylhydrazin. *Folia haemat. (Lpz.)* 62, 345 (1941)
76. MULDER, E. and L.L.M. van DEEMEN: Metabolism of red cell lipids. I. Incorporation in vitro of fatty acids into phospholipids from mature erythrocytes. *Biochem. Biophys. Acta* 106, 106 (1965)
77. NECHELES, T.F., T.A. BOLLS and D.M. ALLEN: Erythrocyte glutathione-peroxidase deficiency and hemolytic disease of the newborn infant. *J. Pediat.* 72, 319 (1968)
78. NECHELES, T.F., N. MALDONADO, A. BARQUET - CHEDIAK and D.M. ALLEN: Homozygous erythrocyte glutathione-peroxidase deficiency: Clinical and biochemical studies. *Blood* 33, 164 (1969)
79. NEERHOUT, R.C.: Erythrocyte Lipids in the Neonate. *Pediat. Res.* 2, 172 (1968)
80. NENCI, G.G., E. del PIANO e B. LISI: Comportamento della produzione dei corpi di Heinz, delle attività glucoso-6-fosfato-deidrogenasica e glutatione-reduttasica, della concentrazione e della stabilità del glutatione ridotto in eritrociti irradiati in vivo ed in vitro. *Haematologica* 52, 551 (1967)
81. OORT, M., J.A. LOS and H.K. PRINS: Hereditary Absence of Reduced Glutathione in the Erythrocytes - a New Clinical and Biochemical Entity? *Vox Sang. (Basel)* 6, 370 (1961)
82. PAPPENHEIM, A. und T. SAZUKI: Weitere Mitteilungen zur Kenntnis der Heinzschen Vergiftungskörperchen. *Folia haemat.* 13, 205 (1912)
83. POHL, A. und K. MOSER: Erythrocytenphospholipide. In: Stoffwechsel und Membranpermeabilität von Erythrocyten und Thrombocyten, hrsg. von DEUTSCH, GERLACH und MOSER, Thieme Verlag, Stuttgart 1968, p. 357

84. REED, C.F.: Phospholipid Exchange Between Plasma and Erythrocytes in man and the dog.
J. clin. Invest. 47, 749 (1968)
85. RENTSCH, G.: Genesis of Heinz Bodies and Methemoglobin Formation.
Biochem. Pharmacol. 17, 423 (1968)
86. RENTSCH, G.: Development of Heinz Body and their biochemical properties.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharm. exp. Path. 259, 189 (1968)
87. RENTSCH, G. and D. WITTEKIND: Methylene Blue and erythrocytes in the Living Animal. Contribution to the Toxicology of Methylene Blue and Formation of Heinz Bodies.
Toxic. appl. Pharm. 11, 81 (1967)
88. RIESS, L.: Über Vergiftung mit chloressigsaurem Kalium.
Berl. klin. Wschr. 19, 785 (1882)
89. RIFKIND, R.A.: Heinz body anemia: an ultrastructural study. II. Red cell Sequestration and Destruction.
Blood 26, 433 (1965)
90. RIFKIND, R.A. and D. DANON: Heinz body anemia: an ultrastructural study. I. Heinz Body Formation.
Blood 25, 885 (1965)
91. RITTER, R. und U. SCHULZE: Methämoglobinämie bei einem Säugling infolge Nitritvergiftung durch Kohlrabimahlzeit.
Dt. Ärztebl. 42, 3091 (1970)
92. ROTHSTEIN, A.: Membrane Permeability of Erythrocytes.
In: Stoffwechsel und Membranpermeabilität von Erythrocyten und Thrombocyten, hrsg. von DEUTSCH, GERLACH und MOSER, Thieme Verlag, Stuttgart 1968, p. 407
93. SANSONE, G., BORRONE, C e S. ROVELI: Suscettibilità degli eritrociti a formare corpi di Heinz in vitro in condizioni normali (neonati e lattanti) e patologiche (favismo e talassemia).
Boll. Soc. ital. Biol. sper. 34, 1561 (1958)
94. SCHAFER, W.B.: Acute Hemolytic Anemia related to Naphthalene. Report of a Case in a Newborn Infant.
Pediatrics 2, 172 (1951)
95. SCHRÖTER, W.: Drug susceptibility and the Development of Erythrocyte Enzyme Systems. In: Nutricia Symposium Metabolic Processes in the Foetus and Newborn Infant.
Edit.: J.H.P. JONKIS, H.K.A. VISSER, J.A. TROELSTRA und H.E. STENFERT KROESE.
Leiden 1971, pp. 73 - 90.

96. SCHRÖTER, W. und K. BITTER: Die Bedeutung intracellulärer und membrangebundener SH-Gruppen für die Stabilität von Neugeborenenerythrocyten.
Klin. Wschr. 47, 727 (1969)
97. SCHÜTZ, E. und W. KÜNZER: Zur Lokalisierung und Morphologie von Heinzschen Körpern.
Folia haemat. N.F. 5, 41 (1961)
98. SCHWAB, M.L.L. and A.E. LEWIS: An improved stain for Heinz Bodies.
Am. J. Clin. Path. 51, 673 (1969)
99. SPICER, S.S. and E.C. THOMPSON: Heinz body formation in vivo a property of methylene blue.
J. Indust. Hyg. Toxicol. 31, 206 (1949)
100. TOJA, G.T.: Untersuchungen über Heinzkörperbildung und Glutathionstabilität in Erythrocyten von Neugeborenen.
Z. Kinderheilk. 84, 484 (1960)
101. TUDHOPE, G.R. and S.P. LEECE: Red-Cell Catalase and the Production of Methaemoglobin, Heinz Bodies and Changes in Osmotic Fragility due to Drugs.
Acta haemat. 45, 290 (1970)
102. UHLENBRUCK, G. und G.I. PARDOE: Die Struktur der Erythrocytenoberfläche.
In: Stoffwechsel und Membranpermeabilität von Erythrocyten und Thrombocyten, hrsg. von DEUTSCH, GERLACH und MOSER, Thieme Verlag, Stuttgart 1968, p. 342
103. ULUKUTLU, I., E. KLEIHAEUER und K. BETKE: The behaviour of foetal haemoglobin in the enhanced Heinz Body formation in red cells of newborn infants.
Acta Paediat. Scand. 55, 473 (1966)
104. VALAES, T., S.A. DOXIADIS and P. FESSAS: Acute hemolysis due to naphthalene inhalation.
J. Paediat. 63, 904 (1963)
105. VEST, M.: Der Einfluß von Naphthohydrochinonderivaten (wasserlöslichen Vitamin-K-Ersatzpräparaten, Synkavit) auf Erythrocytenabbau und -regeneration bei Frühgeburten und auf das Glucuronidbildungsvermögen der Leber in vitro.
Schweiz. Med. Wschr. 40, 969 (1958)
106. VETRILLA, M., W. BARTHELMAT und J. RIETKÖTTER: Aktivität der Glutathion-Peroxidase in Erythrocyten vom Fetal- bis zum Erwachsenenalter.
Klin. Wschr. 48, 85 (1970)

107. WALLER, H.D., G.W. LÖHR und M. TABATABAI: Hämolyse und Fehlen von Glucose-6-Phosphatdehydrogenase in roten Blutzellen (eine Fermentanomalie der Erythrocyten). Klin. Wschr. 35, 1022 (1957)
108. WALLER, H.D. und G.W. LÖHR: Neue Ergebnisse zum Mechanismus der Heinzkörperbildung in Erythrocyten. Folia haemat. N.F. 8, 1 (1963)
109. WALLER, H.D. und H.D. SCHOEN: Heinzkörperbildung und GSH - Gehalt in Erythrocyten mit Glucose-6-Phosphatdehydrogenase - Mangel und Glutathionsynthesestörung nach Röntgenbestrahlung in vitro. Klin. Wschr. 44, 189 (1966)
110. WARBURG, O., F. KUBOWITZ und W. CHRISTIAN: Über die Wirkung von Phenylhydrazin und Phenylhydroxylamin auf den Stoffwechsel der roten Zellen. Biochem. Zeitschr. 242, 170 (1931)
111. WEBSTER, S.H.: Heinz Body Phenomenon in Erythrocytes. Blood 4, 479 (1949)
112. WEED, R.I.: Disorders of Red Cell Membrane: History and Perspectives. Seminars in Hematology 7, 249. (1970)
113. WEISE, W., J. NIEDER und G. AGATTA: Über die Heinzkörperbildung durch konventionelle Röntgenstrahlen bei Kollumkarzinom-Patientinnen. Zbl. Gynäk. 93, 1441 (1971)
114. WILLI, H.: Innenkörperbildung durch Elkosin und spontane Innenkörperbildung. Schweiz. Med. Wschr. 77, 243 (1947)
115. WITTEKIND, D. und G. RENTSCH: Erzeugung von Heinzkörpern durch Vitalfarbstoffe. Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmac. exp. Path. 256, 64 (1967)
116. ZINKHAM, W.H.: An in vitro abnormality of glutathione metabolism in erythrocytes from normal newborns: Mechanism and clinical significance. Pediatrics 23, 18 (1959)
117. ZINKHAM, W.H. and B. CHILDS: Effect of Vitamin K and Naphthalene Metabolites on Glutathione Metabolism of Erythrocytes from normal Newborns and Patients with Naphthalene Hemolytic Anemia. Am. J. Dis. Child. 98, 420 (1957)
118. ZUELZER, W.W. and C. APT: Acute hemolytic anemia due to naphthalene poisoning. J. Am. Med. Assoc. 141, 185 (1949)

Herrn Prof. Dr. E. Kleihauer danke ich für die Überlassung des Themas und seine freundliche und rasche Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. E. Kohne, die meine Arbeit in allen Abschnitten unterstützt, mich angeleitet und mir stets wertvolle Anregungen gegeben hat. Ihr verdanke ich die Einführung in die Planung und Methodik von Versuchen. Gedankt sei an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. K. Betke für die Möglichkeit, diese Untersuchungen in seiner Klinik durchzuführen.

L E B E N S L A U F

Am 26. September 1944 wurde ich, Rainer Harnisch, als zweites Kind des praktischen Arztes Dr. Rolf Harnisch und seiner Ehefrau Gertrud, geb. Boehle, in Gera geboren. 1945 siedelten wir nach Frankfurt am Main über; dort wurde ich 1951 eingeschult und kam 1955 auf das humanistische Lessing-Gymnasium, an dem ich am 5. März 1964 das Abitur bestand.

Nachdem ich am 31.3.1966 nach zweijährigem Wehrdienst als Leutnant zur See d.R. entlassen worden war, begann ich im Sommersemester 1966 mein Medizinstudium an der Ludwig-Maximilian-Universität in München. Nach dem Physikum im Oktober 1968 studierte ich 1 Jahr in Montpellier; in München beendete ich im Dezember 1971 mein Studium mit dem medizinischen Staatsexamen.

Die Medizinalassistentenzeit leistete ich vom 1. Mai bis 20. September 1972 und vom 1. August bis 31. Dezember 1973 in der Medizinischen und Chirurgischen Klinik der Krankenanstalten "Bergmannsheil" in Bochum ab. Vom 1. Oktober 1972 bis 12. Juli 1973 arbeitete ich mit Hilfe eines Stipendiums des Deutschen Akademischen Austauschdienstes und der Französischen Regierung im Centre de Recherches Biologiques und im Institut Médico-Psycho-Pédagogique in Paris.

